

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Filip Vymyslický

Použití statistického přístupu pro vývoj HPLC metod

Utilization of statistical approach in development of HPLC methods

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.**

Konzultant: **Ing. Jakub Petřík**

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14. května 2019.

.....
podpis

Abstrakt

Cílem této diplomové práce byl vývoj systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu design of experiments. Systém byl vyvinut na základě vývoje tří HPLC metod na stanovení čistoty účinných látek.

Při vývoji systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu byla jako první vybrána HPLC metoda stanovení čistoty esomeprazolu. Pomocí přístupu design of experiments byl prozkoumán experimentální prostor v okolí metody za účelem nalézt vhodnější nastavení podmínek separace.

Druhou metodou použitou pro vytvoření systému byla metoda stanovení čistoty bisoprololu. Metoda byla převedena na kolonu menších rozměrů a bylo upraveno složení vodné složky mobilní fáze oproti původní lékopisné metodě. Pomocí přístupu design of experiments byl prozkoumán experimentální prostor za účelem nalezení vhodnějších podmínek separace.

Poslední byla zvolena metoda na stanovení čistoty risperidonu. Oproti původní lékopisné metodě byla změněna vodná složka mobilní fáze. Byl prozkoumán experimentální prostor v okolí metody přístupem design of experiments s cílem nalézt nejvhodnější podmínky separace.

Pro všechny studované HPLC metody byly hodnoty sledovaných chromatografických parametrů získány průzkumem experimentálního prostoru a poté statisticky zpracovány metodou nejmenších čtverců. Nakonec byl proveden screening kolon u všech studovaných HPLC metod, který byl vyhodnocen analýzou hlavních komponent a interpretován grafem komponentního skóre.

Abstrakt

The aim of this diploma thesis was to develop a systematic procedure for the development of HPLC methods using the design of experiments. The system was developed based on the development of three HPLC methods for the determination of the purity of active substances using the design of experiments approach.

The HPLC method for determining the purity of esomeprazole was selected to develop the systematic process for the development of HPLC methods by statistical approach. Experimental space was explored to find more suitable separation conditions.

The second method used to develop the systematic procedure was the method for determining the purity of bisoprolol. This method was converted to a column of smaller size and the composition of the aqueous part of mobile phase was modified compared with the original pharmacopoeial method. Experimental space was explored to find more suitable separation conditions using the design of experiments.

Last the method for determining the purity of risperidone was chosen. The composition of the aqueous part of mobile phase was changed in contrast to the original pharmacopoeial method. Experimental space was explored to find more suitable separation conditions using the design of experiments.

For all studied HPLC methods, the values of the monitored chromatographic parameters were obtained by exploration of the experimental space. The partial least squares method was used for statistical evaluation of the data obtained.

Finally, column screening was performed on all studied HPLC methods. Column screening was evaluated by principal component analysis and interpreted by a scatter plot.

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému konzultantovi Ing. Jakubu Petříkovi za trpělivost, užitečné rady a čas který obětoval při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za odborné vedení a hlavně trpělivost při vypracování této diplomové práce.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	10
Seznam použitých symbolů	12
1 Úvod	13
2 Cíl práce	14
3 Teoretická část	15
3.1 Design of experiments	15
3.1.1 Taghuchiho lineární model L18.....	16
3.1.2 Metoda částečných nejmenších čtverců	16
3.1.3 Projekce významnosti proměnných.....	16
3.1.4 Graf koeficientů.....	17
3.1.5 Sweet spot	17
3.1.6 Optimalizér	18
3.1.7 Analýza hlavních komponent.....	18
3.2 Faktory ovlivňující chromatografickou separaci	18
3.2.1 Mobilní fáze.....	18
3.2.1.1 Pufr a jeho pH	19
3.2.2 Teplota.....	19
3.3 Stacionární fáze.....	20
3.3.1 F5.....	20
3.3.2 C8 a C18	21
3.3.3 Phenyl-hexyl a biphenyl.....	21
3.4 Technologie výroby kolon	21
3.4.1 Technologie ethylenových můstků.....	21
3.4.2 Technologie pevného jádra.....	22
3.5 Chromatografické parametry	22
3.5.1 Rozlišení	23

3.5.2 Diskriminační faktor	24
3.5.3 Separační oblast.....	25
3.5.4 Centrální pozice.....	26
3.5.5 USP tailing	27
3.6 Studované účinné látky.....	28
3.6.1 Esomeprazol	28
3.6.2 Metody stanovení esomeprazolu	29
3.6.3 Bisoprolol.....	30
3.6.4 Metody stanovení bisoprololu	30
3.6.5 Risperidon	32
3.6.6 Metody stanovení risperidonu	32
4 Experimentální část.....	34
4.1 Materiál a přístroje.....	34
4.1.1 Chemikálie	34
4.1.2 Přístroje a software	34
4.1.3 Kolony	35
4.1.4 Kapalinové chromatografy	35
4.2 Esomeprazol	36
4.2.1 Metoda stanovení čistoty esomeprazolu	36
4.2.2 Optimalizovaná metoda stanovení čistoty esomeprazolu	37
4.3 Bisoprolol	38
4.3.1 Metoda stanovení čistoty bisoprololu	38
4.3.2 Optimalizovaná metoda stanovení čistoty bisoprololu.....	39
4.4 Risperidon.....	40
4.4.1 Metoda stanovení čistoty risperidonu	40
4.4.2 Optimalizovaná metoda stanovení čistoty risperidonu.....	41
5 Výsledky a diskuze	42

5.1 Vývoj systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí přístupu DoE	42
5.2 Esomeprazol	42
5.2.1 Cíle.....	42
5.2.2 Volba nezávisle proměnných	42
5.2.3 Volba závisle proměnných	44
5.2.4 Plán experimentů	44
5.2.5 Vyhodnocení design of experiments	46
5.2.6 Vyhodnocení screeningu kolon	53
5.2.7 Diskuze esomeprazol.....	55
5.3 Bisoprolol	56
5.3.1 Cíle.....	56
5.3.2 Převod a úprava metody.....	56
5.3.3 Volba nezávisle proměnných	58
5.3.4 Volba závisle proměnných	59
5.3.5 Plán experimentů	59
5.3.6 Vyhodnocení design of experiments	60
5.3.7 Vyhodnocení screeningu kolon	66
5.3.8 Diskuze bisoprolol	68
5.4 Risperidon.....	69
5.4.1 Cíle.....	69
5.4.2 Volba nezávisle proměnných	69
5.4.3 Volba závisle proměnných	71
5.4.4 Plán experimentů	71
5.4.5 Vyhodnocení design of experiments	73
5.4.6 Vyhodnocení screeningu kolon	80
5.4.7 Diskuze risperidon	82
6 Závěr	84

Seznam použité literatury.....	86
Přílohy	91

Seznam použitých zkratk

AcN	Acetonitril
BEH	Ethylene bridged hybrid technology Technologie hybridních ethylenových můstků
CP	Center position Centrální pozice
CP _{lim}	Center position limit Limit centrální pozice
C8	Octylsilan stationary phase Oktylsilanová stacionární fáze
C18	Octadecyl stationary phase Oktadecylsilanová stacionární fáze
DF	Discrimination factor Diskriminační faktor
DOE	Design of experiments Metoda plánování experimentů
ESO	Esomeprazol
F5	Pentafluorophenyl stationary phase Pentafluorfenylová stacionární fáze
HPLC	High-performance liquid chromatography Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
L18	Taguchi linear model L18 Taguchiho lineární model L18

MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MLR	Multi-linear regression Multilineární regrese
MS	Mass spectrometry Hmotnostní spektrometrie
OFAT	One factor at the time Optimalizace faktorů jednoho po druhém
PCA	Principal Component Analysis Analýza hlavních komponent
PLS	Partial least squares Metoda částečných nejmenších čtverců
P-H	Phenylhexyl stationary phase Fenylhexylová stacionární fáze
RH	Relative humidity Relativní vlhkost
SA	Separation area Separační oblast
SST	System suitability test Test způsobilosti systému
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography Ultraúčinná kapalinová chromatografie
VIP	Variable importance in the projection Projekce významnosti proměnných

Seznam použitých symbolů

pK_a	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
D_m	Difuzní koeficient
ψ	Asociační faktor rozpouštědla
M_r	Relativní molekulová hmotnost
T	Absolutní teplota
v_{mol}	Molární objem rozpouštědla
ΔH	Změna entalpie
ΔS	Změna entropie
R	Univerzální plynová konstanta
$\ln \beta$	Přirozený logaritmus poměru objemu stacionární fáze k objemu mobilní fáze
$\ln k$	Přirozený logaritmus retenčního faktoru
t_r	Retenční čas
R	Rozlišení
w	Šířka píku
f	Vzdálenosti mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku
h_v	Výška údolí mezi dvěma sousedními píky
h_p	Výška píku
v/v	Objemový poměr

1 Úvod

Ve farmaceutickém průmyslu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) jednou z nejpoužívanějších analytických metod. Při vývoji HPLC metod je kladen důraz na rychlost vývoje metody a nalezení nejvhodnějších podmínek separace. Pro vývoj HPLC metod je možné použít dva přístupy. První přístup se nazývá „One factor at the time“, kdy optimalizujeme jednotlivé experimentální faktory jeden po druhém. Druhý přístup se nazývá „design of experiments“, a optimalizujeme při něm více faktorů najednou.

Běžně používaný přístup „One factor at the time“ má jisté nevýhody. Při tomto přístupu prozkoumáme pouze malou část experimentálního prostoru, takže není jisté, že najdeme opravdu optimální podmínky. V některých případech může skutečné optimum ležet mimo prozkoumanou část experimentálního prostoru. Ve výsledku pak může být zavedena a používána metoda, která má horší výkonnostní parametry, co se týče účinnosti separace a selektivity, je časově náročnější nebo nákladnější.

Při přístupu „design of experiments“ naproti tomu prozkoumáme celý experimentální prostor, takže je výrazně vyšší pravděpodobnost, že nalezneme skutečně optimální podmínky. Využití statistického přístupu navíc výrazně snižuje počet experimentů, které je třeba v rámci optimalizace provést. Zavedení přístupu „Design of experiments“ do vývoje HPLC metod ve farmaceutickém průmyslu je výhodné, protože přináší úspory času, práce i materiálních nákladů. V této diplomové práci je pro vývoj HPLC metod na stanovení čistoty esomeprazolu, bisoprolu a risperidonu použit přístup Design of experiments.

Zkušenosti z vývoje těchto metod jsou následně využity pro sestavení návodu na systematický postup při vývoji HPLC metod pomocí přístupu Design of experiments, který bude sloužit pro rutinní vývoj metod.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit systematický postup pro vývoj HPLC metod, které slouží ke stanovení čistoty účinných látek pomocí statistického přístupu Design of experiments. Dalšími cíli bylo prozkoumat a zmapovat experimentální prostory v okolí metod na stanovení čistoty esomeprazolu, bisoprololu a risperidonu a nalézt nejvhodnější podmínky separace.

3 Teoretická část

3.1 Design of Experiments

Design of Experiments (DoE), neboli metoda plánování experimentů, je statistická metoda k řešení komplexních vícefaktorových úloh. V analytické chemii našel přístup DoE uplatnění například jako statistická metoda pro vývoj a optimalizaci HPLC metod¹. Pro aplikaci přístupu DoE je důležité nejprve vybrat vhodný statistický model a poté je třeba zvolit vhodné nezávisle proměnné a jejich úrovně. V případě vývoje a optimalizace HPLC metod mohou být použity kvalitativní nezávisle proměnné, jako je typ stacionární fáze, jehož úrovně budou jednotlivé druhy stacionární fáze, a kvantitativní nezávisle proměnné, jako je teplota, jejíž úrovně budou jednotlivé hodnoty teploty.

Následně je nutné zvolit sledované závisle proměnné. V případě vývoje a optimalizace HPLC metod jsou to kupříkladu rozlišení jednotlivých píků, separační oblast nebo symetrie hlavního píku. Zvolené nezávisle proměnné a jejich úrovně budou pomocí zvoleného statistického modelu prokombinovány za účelem co nejefektivnějšího prozkoumání experimentálního prostoru daného systému². Po provedení vygenerovaných experimentů je nezbytné vyhodnotit sledované závisle proměnné. Za pomoci získaných dat poté vyhodnotit vliv jednotlivých nezávisle proměnných na závisle proměnné a zobrazit si experimentální prostor a určit optimální kombinaci nezávisle proměnných daného systému.

Výhodou přístupu DoE oproti přístupu „One factor at the time” (OFAT), běžně používanému v analytické chemii, je menší časová náročnost a větší efektivita při prozkoumávání experimentálního prostoru a hledání optimálních podmínek systému. Tato výhoda vyplývá z faktu, že při přístupu DoE měníme více nezávisle proměnných najednou, oproti přístupu OFAT, kde se vždy mění pouze jedna nezávisle proměnná a ostatní zůstávají konstantní. Další nevýhodou přístupu OFAT je, že při něm můžeme nalézt zdánlivě optimální podmínky, které se ale po prozkoumání celého experimentálního prostoru mohou projevit pouze jako lokální optimum, přičemž globální optimum se nachází v jiné části experimentálního prostoru³.

3.1.1 Taguchiho lineární model L18

Taguchiho lineární modely jsou nejpoužívanějšími modely ve fázi screeningu nebo při testování robustnosti⁴. Lineární plán L18, který byl použit při řešení této diplomové práce, obsahuje jednu nezávisle proměnnou na 2 úrovních a až 7 nezávisle proměnných na 3 úrovních. Model se vždy skládá z 18 experimentů a 3 tzv. centrálních bodů, které jsou výchozími body experimentálního prostoru⁵.

3.1.2 Metoda částečných nejmenších čtverců

Metoda částečných nejmenších čtverců (partial least squares, PLS) je metoda pro vyhodnocení naměřených dat získaných z vygenerovaných experimentů. PLS je vícerozměrná regresní metoda, používaná při vyhodnocování složitých vícefaktorových úloh nebo pokud úloha obsahuje velké množství dat.

Metoda PLS je také schopna lépe pracovat s nulovými hodnotami či chybějícími daty oproti běžně používané multilineární regresi (MLR)⁶. Mezi nástroje používané pro interpretaci dat vyhodnocených metodou PLS patří projekce významnosti proměnných, graf koeficientů, sweet spot plot nebo optimalizér³.

3.1.3 Projekce významnosti proměnných

Projekce významnosti proměnných neboli VIP plot (variable importance in projection) je nástroj sloužící k interpretaci dat vyhodnocených metodou PLS. Jedná se o sloupcový graf znázorňující míru celkové významnosti vlivu studovaných nezávisle proměnných na vytvořený model⁷. Přesáhne-li hodnota faktoru hodnotu 0,8 lze danou nezávisle proměnnou považovat za významnou, je-li však hodnota nezávisle proměnné menší než 0,8 lze prohlásit, že ze statistického hlediska studovaná nezávisle proměnná významně neovlivňuje daný model³.

Projekce významnosti proměnných je vhodným nástrojem především na začátku interpretace získaných dat, protože nám dává pouze informaci o významnosti sledované nezávisle proměnné v rámci celého modelu, ne však informace o jejím vlivu na jednotlivé závisle proměnné.

3.1.4 Graf koeficientů

Graf koeficientů (Coefficient plot) je sloupkový graf znázorňující hodnoty regresních koeficientů a variabilitu dat. Tento typ interpretace dat, na rozdíl od projekce významnosti proměnných, sděluje individuální vliv jednotlivých nezávisle proměnných na závisle proměnné. Pokud se hodnota koeficientu pro daný faktor pohybuje v kladných hodnotách, lze říci, že zvyšování hodnoty této nezávisle proměnné bude mít pozitivní odezvu³. Je-li hodnota regresního koeficientu nezávisle proměnné v záporných hodnotách, dochází k opačnému efektu. Každé nezávisle proměnné přísluší interval spolehlivosti, který podává informaci o relevanci získané informace.

3.1.5 Sweet spot plot

Sweet spot plot je nástroj, s jehož pomocí lze interpretovat experimentální prostor. Zvolíme-li konstantní hodnoty vybraných úrovní kvalitativních nezávisle proměnných a určíme meze přijatelných hodnot pro závisle proměnné, lze vyobrazit experimentální prostor v podobě dvojrozměrného grafu. Z grafu lze následně vyčíst informace o optimálních podmínkách a jejich robustnosti v rámci stanovených mezí závisle proměnných. Část experimentálního prostoru, kde jsou splněny všechny stanovené meze, se nazývá sweet spot. Sweet spot je zpravidla zvýrazněn zelenou barvou, naopak části nesplňující všechny stanovené meze jsou od sebe odděleny a barevně rozlišeny^{3,8}.

3.1.6 Optimalizér

Optimalizér je nástroj sloužící k vypočítání optimálních podmínek napříč celým statistickým modelem. Na základě zadaných mezí závisle proměnných (minimum, cíl a maximum) optimalizér vypočítá optimální hodnoty nezávisle proměnných, při nichž je dosaženo nejlepších hodnot závisle proměnných v rámci zadaných mezí³.

3.1.7 Analýza hlavních komponent

Při analýze hlavních komponent (PCA) dochází k transformaci dat z primárních proměnných na menší počet latentních proměnných neboli hlavních komponent. Hlavní komponenty jsou lineární kombinací původních proměnných, jsou vzájemně nekorelovatelné a vystihují téměř celou proměnlivost dat. Hlavních komponent je výrazně méně než původních proměnných a mají lepší vlastnosti. První hlavní komponenta nám popisuje největší část rozptylu dat. Druhá hlavní komponenta popisuje druhou největší část rozptylu dat, která není obsažená v první hlavní komponentě⁹.

Grafickou pomůckou pro znázornění výsledků PCA v této diplomové práci byl rozptylový diagram komponentního skóre (Scatter plot). Ten nejčastěji zobrazuje hodnoty prvních dvou komponent. V diagramu pak lze nalézt buďto shluky objektů s podobnými vlastnostmi nebo odlehle či silně odlišné objekty¹⁰.

3.2 Faktory ovlivňující chromatografickou separaci

Schopnost chromatografické metody separovat analyty je dána chromatografickými parametry. Mezi chromatografické parametry patří složení mobilní fáze, teplota na koloně, typ stacionární fáze, průtok mobilní fáze nebo objem nástřiku vzorku. Vhodnou změnou jednoho nebo více parametrů, lze dosáhnout lepších vlastností chromatografické metody.

3.2.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze je velmi důležitým faktorem pro chromatografický systém a má velký vliv na účinnost separace, rozlišení, citlivost a dobu analýzy. Pro analýzy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC) se jako mobilní fáze nejčastěji používá směs vodného pufru a polárního organického rozpouštědla. Polarita rozpouštědla roste v řadě tetrahydrofuran, methanol, acetonitril a voda¹¹. Při výběru mobilní fáze je nutné zohlednit požadavky, jako je kompatibilita s detektorem, čistota, chemická inertnost, nízká korozivita, toxicita, těkavost nebo rozpustnost analytu.

3.2.1.1 Pufr a jeho pH

Polární látky a látky iontové povahy se na nepolárních stacionárních fázích zadržují velmi slabě nebo vůbec a eluují s mrtvým objemem kolony. Analyty iontové povahy lze v případě, že se jedná o soli slabých kyselin nebo zásad ovlivnit vhodnou volbou pufru a jeho pH. Změnou pH dojde k potlačení disociace a k zvýšení retence na reverzní fázi a k potlačení jevu chvostování píku¹². V **Tab. 1** je k nahlédnutí seznam běžně používaných pufrů a rozsah jejich pH.

Tab. 1 Přehled běžně používaných pufrů v RP-HPLC¹³.

Pufr	pK _a	rozsah pH
Fosfátový	2,1	1,1-3,1
	7,2	6,2-8,2
	12,3	11,3-13,3
Mravenčanový	3,8	2,8-4,8
Octanový	4,8	3,8-5,8
Citrátový	3,1	2,1-4,1
	4,7	3,7-5,7
	5,4	4,4-6,4
Triethylaminový	11,0	10,0-12,0
Pyrolidinový	11,3	10,3-12,3
Borátový	9,23	8,3-10,3

3.2.2 Teplota

Díky technologickému pokroku jsou v dnešní době běžně dostupné stacionární fáze s velkou tepelnou stabilitou, jako například fáze na bázi oxidu titaničitěho nebo zirkoničitěho s teplotním maximem až 150 °C. Pro stacionární fáze na silikagelové bázi nepřesahuje teplotní maximum 60 °C, při vyšších teplotách dochází k jejich degradaci¹². Použitím vyšších teplot dojde ke snížení viskozity rozpouštědla, tím pádem také ke snížení tlaku na koloně, to nám dovolí použít vyšší průtokové rychlosti a tím dosáhnout rychlejší separace. Vliv teploty na hodnotu difuzního koeficientu D_m popisuje rovnice:

$$D_m = \frac{1,17 \cdot 10^{-12} \cdot (\Psi \cdot M_R)^{0,5} \cdot T}{\eta \cdot v_{mol}^{0,6}}$$

Kde v_{mol} je molární objem rozpouštědla, M_r je relativní molekulová hmotnost rozpouštědla, T je absolutní teplota a ψ je asociační faktor rozpouštědla. Ze vzorce můžeme vyčíst, že difuzní koeficient je přímo úměrný teplotě a nepřímo úměrný viskozitě rozpouštědla¹⁴.

Kromě rychlosti difúze ovlivňuje teplota také retenci analytů. Tento vliv je popsán van't Hoffovou rovnicí pro nepolární analyty, kde ΔH a ΔS jsou změny entalpie a entropie rozpouštěné látky v chromatografickém systému, R je univerzální plynová konstanta, β vyjadřuje poměr objemu stacionární fáze k objemu mobilní fáze a k značí retenční faktor. S rostoucí teplotou roste i hodnota retenčního faktoru.

$$-\frac{\Delta H}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta = \ln k$$

V ideálním (teoretickém) systému je závislost $\ln k$ na reciproké hodnotě absolutní teploty $1/T$ lineární¹⁵. Nesmíme také zapomenout na vliv teploty na pH mobilní fáze a na pK_a analytů, které velmi ovlivňuje jejich retenci.

3.3 Stacionární fáze

Stacionární fáze je statickou složkou chromatografického systému. V současné době je k dispozici široký výběr komerčních kolon s různými stacionárními fázemi. Analytický chemik si tak může jen vybrat rozměry kolony, velikost částic a druh stacionární fáze. Při RP-HPLC se nejčastěji používají kolony na bázi silikagelu s chemicky vázanými alkyly¹². V této diplomové práci bylo použito pět typů stacionárních fází a to F5, C8, C18, phenyl-hexyl a biphenyl. Tyto stacionární fáze byly vybrány z důvodu pokrytí všech druhů interakcí.

3.3.1 F5

U pentafluorfenylové fáze se nejvíce uplatňují π/π interakce, ale i nepolární interakce. U stacionární fáze F5 je na silikagel navázán fenyl, na kterém je navázáno pět atomů fluoru. Pro pentafluorfenylové fáze je možné použít 100 % vodné mobilní fáze v rozmezí pH 2,0-8,0 bez rizika zhroucení stacionární fáze. Vysoká elektronegativita fluorových skupin generuje dipólový moment způsobující vyšší retenci polárních sloučenin. Indukovaný dipólový moment také napomáhá retenci neutrálních sloučenin. Analyty obsahující fluor ve své struktuře jsou na tomto typu stacionární fáze silně zadržovány¹². Příkladem použití kolony F5 ve farmaceutickém průmyslu je stanovení antibiotika gentamicin sulfátu¹⁶.

3.3.2 C8 a C18

U kolon C8 a C18 se nejvíce uplatňují hydrofobní interakce. Pro tento typ stacionární fáze platí, že na silikagelu je přichycen alkylový řetězec buďto C8 nebo C18. Tyto reverzní fáze jsou univerzální a vhodné k separaci jak polárních tak i nepolárních látek. Rozmezí pH stability u těchto fází je 1,5–10 v závislosti na výrobci a druhu použitých částic¹⁷. Příkladem použití kolony C8 ve farmacii je kvantitativní stanovení kanabinoidů¹⁸. Dalším příkladem využití kolony C8 je stanovení čistoty účinné látky pentoxyverine citrát¹⁹. V dalším příkladu byla použita kolona C18 pro sledování degradace účinné látky nizatidinu²⁰.

3.3.3 Phenyl-hexyl a biphenyl

Pro fáze s označením Phenyl-hexyl a biphenyl platí, že se pro interakci s analytem uplatňují hydrofobní interakce a π/π interakce. U těchto typů stacionární fáze je na povrchu silikagelu přichycena fenylová skupina připojená hexylovým řetězcem k povrchu silikagelu. V případě biphenylové stacionární fáze jsou na povrchu silikagelu přichyceny dva fenylové kruhy, které způsobují zesílení hydrofobní interakce oproti Phenyl-hexylové fázi. Tyto fáze mají vynikající selektivitu k aromatickým látkám díky fenylovým kruhům. Dále jsou tyto fáze vhodné k separaci nepolárních látek díky hydrofobním interakcím. Rozmezí pH stability pro tyto reverzní fáze se pohybuje v rozmezí 2–9²¹. Příkladem použití kolony Phenyl-hexyl je kvalitativní stanovení psychofarmak²². Příkladem kolony biphenyl je stanovení čistoty adrenalin tartratu²³.

3.4 Technologie výroby kolon

3.4.1 Technologie ethylenových můstků

Kolony modifikované technologií ethylenových můstků (BEH) neboli technologií hybridních ethylenových můstků jsou díky chemické stabilitě schopny pracovat téměř v celém rozmezí pH (1–12). Kolony s BEH technologií jsou také schopné odolávat vysokým tlakům. Tato stabilita je způsobena vložením hybridních ethylenových můstků mezi silanolové skupiny, které zpevňují strukturu takové fáze a zároveň fungují jako skupiny maskující silanolové skupiny (angl. Endcapping groups). V současné době jsou na trhu k dispozici celá škála kolon využívající technologie BEH jako například: BEH C8 a C18, BEH Phenyl-hexyl nebo BEH Hilic²⁴.

3.4.2 Technologie pevného jádra

Kolony s core shell/ fused core silica neboli technologie pevného jádra mohou sloužit jako alternativa k UPLC kolonám. Díky této technologii výroby kolon nemusí analyt difundovat celou částicí a tím se zkrátí doba, kterou stráví analyt na koloně při zachování parametrů separace. Částice jsou tvořeny pevným jádrem o průměru asi 1,7 μm a porézním silikagelovým obalem o šířce asi 0,5 μm . V pórech částic dochází k difuzi analytu a přenosu hmoty²⁴.

3.5 Chromatografické parametry

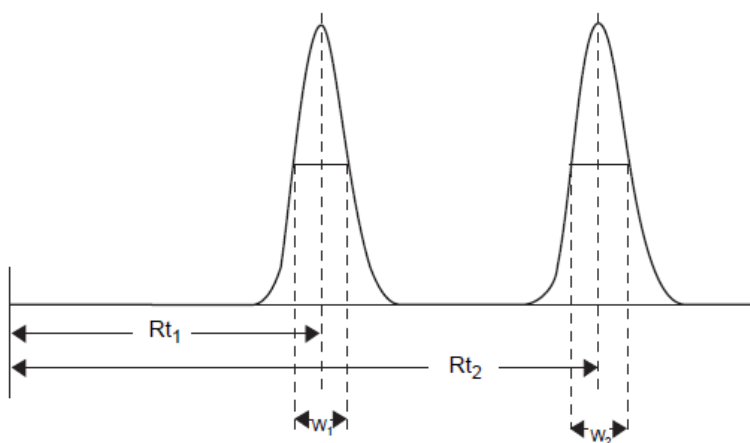
Pro hodnocení kvality separace chromatografické metody jsou využívány chromatografické parametry, jako je rozlišení, diskriminační faktor, separační oblast, centrální pozice nebo USP tailing. Při vývoji a optimalizaci HPLC metod je sledování chromatografických parametrů jedním z hlavních nástrojů.

3.5.1 Rozlišení

Rozlišení je nejčastěji používaná veličina v HPLC sloužící k vyjádření míry separace dvou sousedících analytů. Vzorec pro výpočet rozlišení, který pro výpočet používá software Empower 3 je uveden pod tímto odstavcem. Obecně platí, že hodnota rozlišení větší než 1,5 je považována za dostatečně separované píky.

$$R = \frac{1,18(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2}$$

Rozlišení R se rovná 1,18 násobku rozdílu retenčních časů t_{r2} a t_{r1} podělenému součtem šířky píků w_1 a w_2 v polovině výšky píku²⁵. Nákres parametrů použitých k výpočtu rozlišení je uveden na **Obr. 1**.



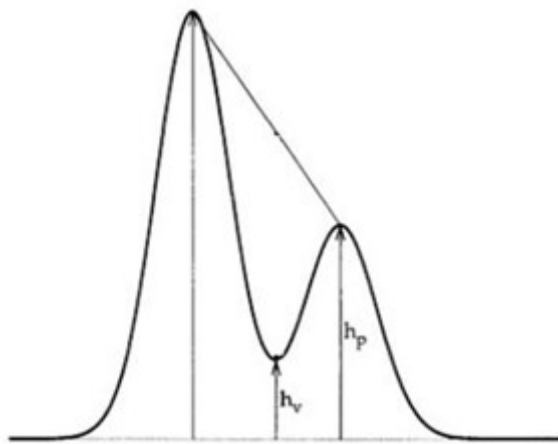
Obr. 1 Nákres parametrů pro výpočet rozlišení (převzato²⁵).

3.5.2 Diskriminační faktor

Diskriminační faktor (DF) je v některých případech vhodnějším nástrojem pro určení, zda jsou dva píky analytů zcela separovány, zvláště v případě, kdy se od sebe tyto píky liší řádově výškou. DF se vypočítá podle vztahu:

$$DF = \frac{h_p - h_v}{h_p}$$

DF se rovná rozdílu výšky menšího píku h_p a výšky údolí h_v děleném výškou menšího píku. Má-li diskriminační faktor hodnotu od 0,9 do 1, je separace příslušných píků považována za dostatečnou²⁶. Nákres parametrů používaných pro výpočet DF je uveden na **Obr. 2**.



Obr. 2 Nákres parametrů pro výpočet diskriminačního faktoru (převzato²⁶).

3.5.3 Separační oblast

Separační oblast (SA) je nástroj sloužící k vyjádření poměrné části z celkové doby analýzy, která slouží k separaci analytů. Zároveň je možno tento parametr použít pro sledování vybrané oblasti chromatogramu a její rozšiřování či zužování, což může popisovat kvalitu separace v dané oblasti. Separační oblast je parametr používaný převážně v přístupu DoE, kde nám slouží ke globálnímu popisu kvality separace v rámci chromatogramu či jeho části. Vzorec pro výpočet SA je následující.

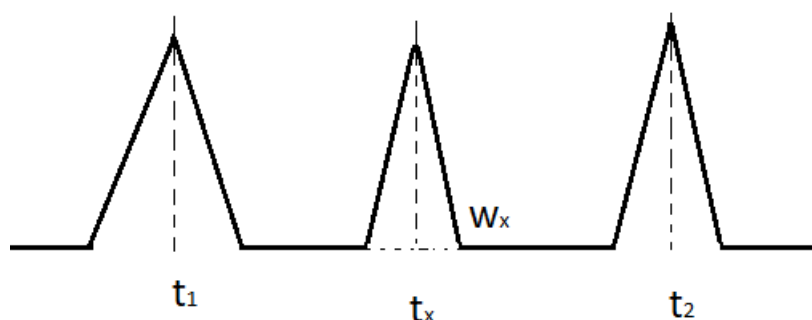
$$SA = \frac{t_{r \text{ posledního píku}} - t_{r \text{ prvního píku}}}{t_{\text{analýzy}}}$$

Separační oblast SA se vypočítá jako rozdíl retenčního času posledního píku sledované oblasti chromatogramu a prvního píku sledované oblasti chromatogramu podělený celkovou dobou analýzy. Separační oblast je bezrozměrná veličina, případně se vyjadřuje v procentech.

3.5.4 Centrální pozice

Centrální pozice (CP, Center position) je chromatografický parametr používaný při vývoji metod pomocí statistického přístupu DoE. Tento parametr sleduje pozici prostředního píku mezi dvěma okolními. Vzorec pro CP je uveden pod tímto odstavcem a schéma parametrů pro jeho výpočet je na **Obr. 3**.

$$CP = \frac{(t_x - t_1) \times (t_2 - t_x)}{(t_2 - t_1)}$$



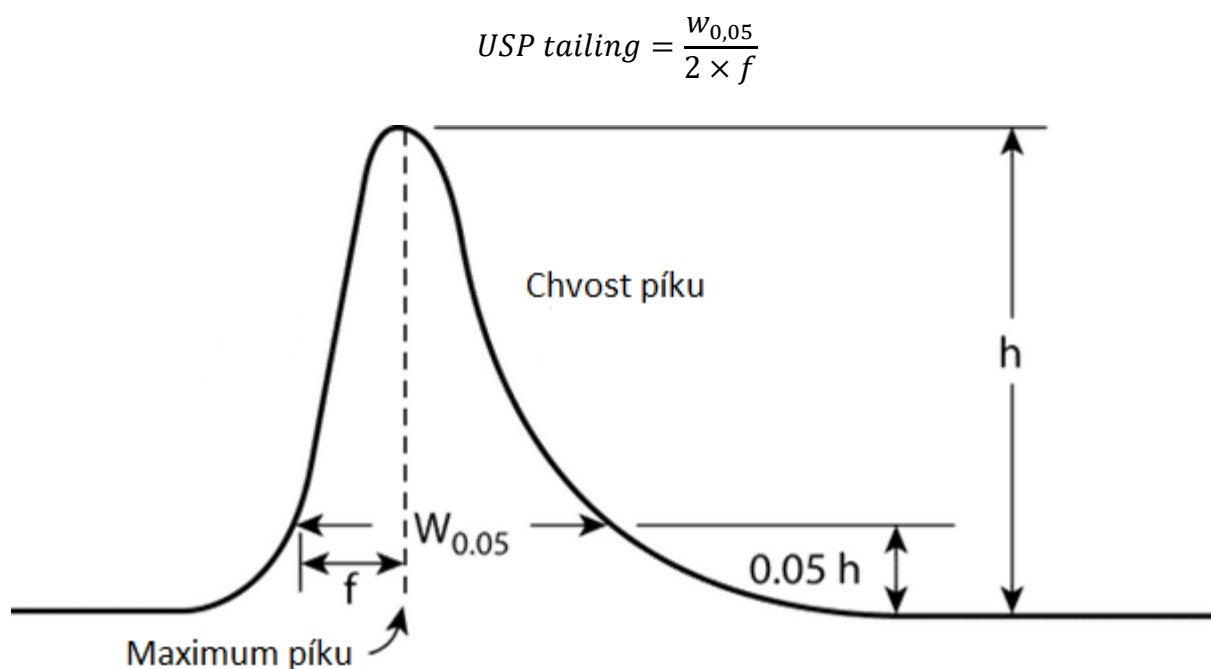
Obr. 3 Nákres parametrů pro výpočet centrální pozice a limitní hodnoty centrální pozice.

Důležitý parametr pro hodnocení centrální pozice je výpočet limitní hodnoty centrální pozice, který určuje minimální hodnotu centrální pozice, kdy kvalitu separace považujeme za dostatečnou. Vzorec pro výpočet limitní hodnoty centrální pozice CP_{lim} jen uveden pod tímto odstavcem.

$$CP_{limit} = 0,25 \times (3 \times w_x)$$

3.5.5 USP tailing

K hodnocení symetrie hlavního píku byl vybrán USP tailing, který je v českém lékopise označován jako faktor symetrie. Tento chromatografický parametr slouží k popisu symetrie píku. Vzorec pro výpočet je uveden pod tímto odstavcem. Pokud má USP tailing hodnotu 1, je pík symetrický^{27,28}. Schéma popisující parametry pro výpočet parametru USP tailing je uveden na **Obr. 4**. USP tailing se vypočítá jako podíl šířky píku v jedné dvacetině jeho maximální výšky ($w_{0,05}$) a dvojnásobku vzdálenosti mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho maximální výšky.



Obr. 4 Nákres parametrů pro výpočet USP tailing.(upraveno²⁷)

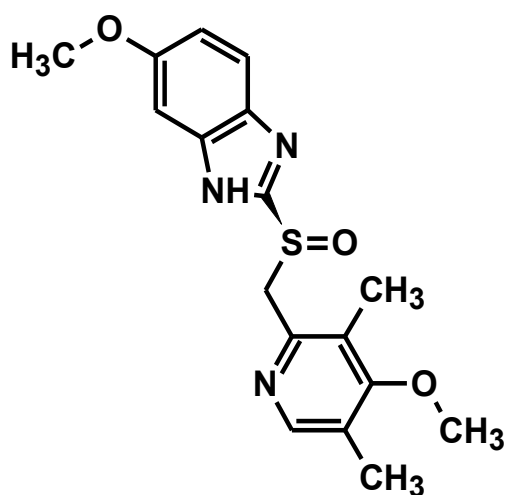
3.6 Studované účinné látky

3.6.1 Esomeprazol

Esomeprazol je bílý prášek málo rozpustný ve vodě, je lépe rozpustný v ethanolu nebo methanolu. Dobře rozpustný je v acetonitrilu. Jeho sumární vzorec je $C_{17}H_{19}N_3O_3S$ a jeho molární hmotnost je 345,417 g/mol²⁹. Struktura esomeprazolu je vyobrazena na **Obr. 5**. Esomeprazol je S-enantiomerem omeprazolu s lepšími farmakodynamickými a farmakokinetickými vlastnostmi, než je tomu u racemátu omeprazolu. Esomeprazol slouží ke snížení sekrece kyseliny chlorovodíkové inhibicí protonové pumpy.

Inhibitory protonové pumpy, jako je esomeprazol, se řadí mezi proléčiva, což jsou léčiva která se přeměňují z neaktivní formy, ve které jsou podávány, na aktivní formu až metabolicky v těle pacienta v tomto případě působením kyselého prostředí žaludku. Aktivní forma léčiva se poté permanentně váže na cysteinovou skupinu na lumenální povrchu H^+/K^+ ATPázy a zabraňuje tvorbě kyseliny chlorovodíkové^{30,31}.

Esomeprazol slouží k léčbě refluxní choroby jícnu, k eradikaci *helicobacter pylori* nebo k léčbě Zollingerova Ellisonova syndromu³².



Obr. 5 Struktura esomeprazolu.

3.6.2 Metody stanovení esomeprazolu

Pro stanovení esomeprazolu bylo vytvořeno a publikováno mnoho metod, které se zabírají nejen stanovením jeho čistoty, ale také jeho enantiomerní čistoty nebo stanovení vedle sebe s jinými léčivy. Metody na stanovení esomeprazolu lze také dohledat v evropském nebo českém lékopise.

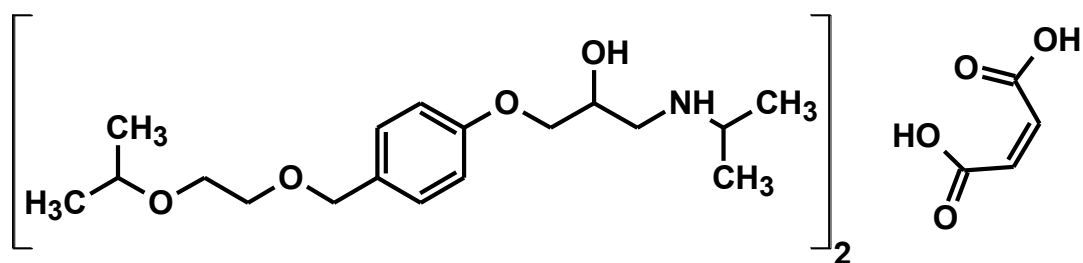
Jednou z publikovaných metod na stanovení čistoty esomeprazolu je metoda na stanovení čistoty esomeprazolu v tabletách. Tato metoda byla použita pro stabilitní studii gastro rezistentních tablet. Metoda byla navržena pro ultraúčinnou kapalinovou chromatografii (UPLC). Jako kolona byla použita Acquity BEH C18 o rozměrech $50 \times 2,1$ mm a velikosti částic $1,7 \mu\text{m}$. Jako složka A mobilní fáze byl použit glycinový pufr o koncentraci $0,04 \text{ mol/l}$ a pH 9, jako složka B sloužila směs acetonitrilu a vody v poměru 90/10 (v/v). Průtok mobilní fáze byl $0,2 \text{ ml/min}$. Esomeprazol a jeho nečistoty se byly detekovány při vlnové délce 305 nm . Celková doba analýzy byla 25 minut³³.

Další metoda se věnovala stanovení nečistot esomeprazolu v tabletách s přídavkem kyseliny acetylsalicylové. Byla určena pro stabilitní studie takto vyrobených tablet. Jako mobilní fáze A byl použit glycinový pufr o koncentraci $0,08 \text{ mol/l}$ a pH 9 a jako složka B byla použita směs acetonitrilu a methanolu v poměru 85/15 (v/v). Jako vhodná kolona byla použita X-Terra RP C8 o rozměrech $150 \times 4,6 \text{ mm}$ a velikosti částic $3,5 \mu\text{m}$. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min . Detekce byla prováděna při 305 nm . Celková doba analýzy byla 50 minut³⁴.

V další metodě na stanovení esomeprazolu se opět jednalo o tablety esomeprazolu s přídavkem kyseliny acetylsalicylové. Zde byla metoda vyvinuta ke stanovení těchto dvou účinných látek vedle sebe. Jako složka A mobilní fáze byl použit $0,2 \%$ roztok H_3PO_4 a jako složka B směs acetonitrilu a methanolu v poměru 50/50 (v/v). Průtok mobilní fáze byl $0,7 \text{ ml/min}$. Jako kolona byla použita Zorbax XBD o rozměrech $50 \times 4,6 \text{ mm}$ a velikosti částic $1,8 \mu\text{m}$. Detekce esomeprazolu i kyseliny acetylsalicylové byla prováděna při vlnové délce 210 nm a celková doba analýzy byla 9 minut³⁵.

3.6.3 Bisoprolol hemifumarát

Bisoprolol hemifumarát je polymorfní, bílý slabě hygroskopický prášek. Je velmi dobře rozpustný ve vodě a snadno rozpustný v methanolu a acetonitrilu. Sumární vzorec bisoprolol hemifumarátu je $C_{40}H_{66}N_2O_{12}$, jeho struktura je vyobrazena na **Obr. 6** a jeho molární hmotnost je 766,97 g/mol²⁹. Bisoprolol patří do skupiny beta-sympatolytik. V závislosti na dávce snižuje bisoprolol krevní tlak a srdeční frekvenci. Dále má antiischemické a kardioprotektivní účinky. Bisoprolol je beta1-selektivní beta-blokátor bez vnitřní sympatomické aktivity nebo membrány stabilizujícího účinku. Oproti jiným beta-blokátorům, jako je metoprolol nebo propranolol, je bisoprolol více kardioselektivní³⁶. Bisoprolol slouží k léčbě chronického srdečního selhání, anginy pectoris nebo k léčbě esenciální hypertenze³⁷.



Obr. 6 Struktura bisoprolol hemifumarátu.

3.6.4 Metody stanovení Bisoprolol hemifumarátu

Publikované metody na stanovení bisoprolol hemifumarátu se zabývají jak kvalitativním důkazem bisoprolol hemifumarátu vedle jiné účinné látky, tak jeho kvantitativním stanovením. Další metody se zabývají nečistotami a degradačními produkty bisoprolol hemifumarátu, které jsou detekovány pomocí UV/VIS detektoru nebo identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Jedna z metod na kvalitativní důkaz bisoprolol hemifumarátu používá kolonu Kromasil 10-SC₁₈ o rozměrech 250 × 4,6 mm. Jako složka A mobilní fáze byl použit 0,001 M fosfátový pufr o pH 3 a jako složka B byl použit Acetonitril. Mobilní fáze byla mísená v poměru 60/40 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Celková doba analýzy byla 10 minut³⁸.

Další publikovaná metoda byla vytvořena pro kvantitativní stanovení bisoprolol hemifumarátu. Coby nejvhodnější kolona byla použita Eclipse XBD C18 o rozměrech 150 × 4,6 mm a velikosti částic 5 µm. Jako mobilní fáze byla použita směs vody, acetonitrilu a methanolu v poměru 50/30/20 (v/v/v) o průtoku 1 ml/min. Při této metodě byl bisoprolol hemifumarát detekován při 225 nm³⁹.

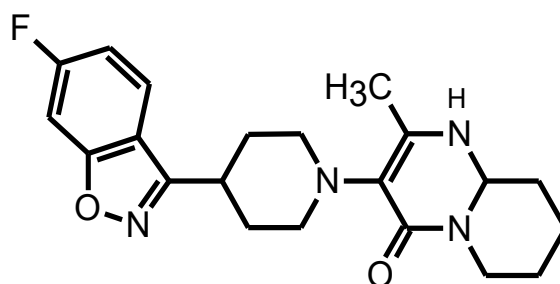
V jiné publikované metodě na kvantitativní stanovení bisoprolol hemifumarátu byla použita kolona Protosil Chromo Band C₁₈ o rozměrech 250 × 4,6 mm a velikosti částic 5 µm. Jako složka A mobilní fáze byl použit roztok připravený rozpuštěním 6,6 g dihydrogenfosforečnanu amonného spolu s 2 ml triethylaminu doplněný na objem 1000 ml vodou pro chromatografii, u připraveného roztoku bylo následně upraveno pH na hodnotu 5,6. Jako složka B byl použit acetonitril. Mobilní fáze byla mísená v poměru 75/25 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml/min. Bisoprolol byl detekován při 226 nm. Celková doba analýzy byla 15 minut⁴⁰.

Další publikovaná HPLC metoda byla vytvořena pro testování kinetiky hydrolýzy bisoprolol hemifumarátu. Jako kolona byla použita EC Nucleosil 100-SC18 o rozměrech 250 × 4,6 mm a velikosti částic 5 µm. Složka A mobilní fáze byla tvořena 0,01 M pufrům dihydrogenfosforečnanu draselného o pH 5,5 s přidavkem 1 ml triethylaminu na 1 litr pufru. Jako složka B byl použit methanol. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min. Celková doba analýzy byla 30 min. Bisoprolol hemifumarát byl detekován při 225 nm⁴¹.

V metodě sloužící k indikaci stability bisoprolol hemifumarátu vedle hydrochlorthiazidu byla použita kolona Zodiac C18 o rozměrech 150 × 4,6 mm a velikosti částic 5 µm. Jako složka A mobilní fáze byl použit 0,1 % roztok kyseliny fosforečné. Jako složka B byl použit acetonitril. Složky mobilní fáze A a B byly směřovány v poměru 80/20 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Bisoprolol hemifumarát spolu s hydrochlorthiazidem byly detekovány při 208 nm⁴².

3.6.5 Risperidon

Risperidon je bílý polymorfní prášek, který je téměř nerozpustný ve vodě a mírně rozpustný v 96 % ethanolu, nejlépe se však rozpouští ve zředěných roztocích kyselin. Struktura risperidonu je vyobrazena na **Obr. 7**, jeho molární hmotnost je 410,49 g/mol a sumární vzorec je $C_{23}H_{23}FN_4O_2$ ²⁹. Risperidon spadá do lékové skupiny antipsychotik. Risperidon je selektivní monoaminergní antagonist s vysokou afinitou k dopaminergnímu D2 a serotoninergnímu 5-HT2 receptoru⁴³. Používá se hlavně při léčbě schizofrenie a bipolární poruchy. Dále se risperidon testuje k léčbě obsesivně kompulzivních poruch^{44,45}.



Obr. 7 Struktura risperidonu.

3.6.6 Metody stanovení risperidonu

O stanovení risperidonu pomocí HPLC bylo publikováno mnoho vědeckých publikací zabývajících se jak získáním kvalitativní, tak i kvantitativní informace ohledně risperidonu, tyto metody je možné získat například z českého nebo evropského lékopisu. Další publikované metody se zabývaly například sledováním degradačních produktů risperidonu.

Jednou z metod zabývajících se sledováním degradačních produktů risperidonu byla metoda, při níž byla jako kolona použita Hypersil BDS C18 o rozměrech 100 × 4,6 mm a velikosti částic 3 μm. Jako složka A mobilní fáze byl použit 30 mM pufr octanu amonného a jako složka B byl použit methanol. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,5 ml/min. Risperidon a jeho degradační produkty byly detekovány pomocí MS detektoru. Celková doba analýzy byla 25 minut⁴⁶.

Další metoda se také zabývala sledováním degradačních produktů. Byla použita kolona Linosorb RP-C18 o rozměrech 250 × 4 mm a velikosti částic 10 μm. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,05 M dihydrogenfosforečnan draselného pufru o pH 7 a methanolu v poměru 35/65 (v/v). Průtok mobilní fáze kolonou byl 1 ml/min. Detekce risperidonu a jeho degradačních produktů byla prováděna při vlnové délce 280 nm⁴⁷.

Pro kvantitativní stanovení risperidonu byla publikována metoda při které byla použita kolona Supelcosil LC₈ DB o rozměrech 250 × 4,6 mm a velikosti částic 5 μm. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,1 M pufru octanu amonného o pH 5,5 a methanolu v poměru 60/40 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Celková doba analýzy byla 9 minut. Detekce risperidonu byla prováděna při 274 nm⁴⁸.

Další metoda byla také vytvořena pro kvantitativní stanovení risperidonu. Jako vhodná kolona zde byla použita Dionex Acclaim 120 C8 o rozměrech 150 × 1,5 mm a velikosti částic 3 μm. Jako mobilní fáze byla použita směs roztoku octanu amonného o koncentraci 5 g/l a methanolu v poměru 20/80 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min. Detekce risperidonu byla prováděna při 260 nm⁴⁹.

4 Experimentální část

4.1 Materiál a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Methanol a acetonitril, oba Ultra gradient HPLC grade zakoupeno od společnosti J.T.BAKER (USA), dihydrogenfosforečnan amonný 98 %, octan amonný 98 % a kyselina octová 99 % zakoupeno od firmy SIGMA-ALDRICH (USA), kyselina fosforečná 85 %, hydroxid amonný 25% zakoupeno od společnosti PENTA (Česká republika), esomeprazol magnesium trihydrát od společnosti LEE PHARM (Indie), nečistoty esomeprazolu A, B, C, D aE od společnosti ZENTIVA k.s (Česká republika), bisoprolol hemifumarát od společnosti MOEHS (Španělsko), standard pro ověření účinnosti chromatografického systému obsahující bisoprolol a nečistotu G, porovnávací roztok B pro bisoprolol obsahující nečistoty A a E od společnosti EDQM (Francie), nečistota K pro bisoprolol od společnosti ZENTIVA k.s (Česká republika), standard pro ověření účinnosti chromatografického systému obsahující risperidon a nečistoty A, B, C, D, E, L, M a roztok obsahující nečistotu K pro risperidon od společnosti EDQM (Francie) a deionizovaná voda připravená pomocí přístroje Milli Q o měrném elektrickém odporu 18,2 MΩ·cm

4.1.2 Přístroje a software

Digitální váha MC 1LC 2200 P SARTORIUS (Německo), ultrazvuková lázeň K-6LE KRAINTEX (Česká Republika), automatická pipeta, GILSON (USA), analytická váha AT-261 Delta Range (Švýcarsko), pH metr Seven Compact METTLER TOLLEDO (Švýcarsko), software Modde Pro UMETRICS (Švédsko), sada nástrojů Microsoft Office (USA), software OriginPro ORIGIN LAB (USA), software Chems sketch ACD LABS (Kanada), software XLstat XLSTAT (USA), software Empower 3 WATERS (USA)

4.1.3 Kolony

Xbridge BEH C8, 2,5 μm , Xbridge BEH Shield RP, 2,5 μm , Xselect CSH Phenyl Hexyl, 2,5 μm zakoupeno od společnosti WATERS (USA), Kinetex C8, 2,6 μm , Kinetex C18, 2,6 μm , Kinetex Polar 2,6 μm , Luna OMEGA PS, 3 μm , Kinetex EVO, 2,6 μm , Kinetex Phenyl-Hexyl, 2,6 μm , Kinetex Biphenyl, 2,6 μm , Kinetex F5, 2,6 μm zakoupené od společnosti PHENOMENEX (USA), Ascentis Express C18; 2,7 μm , Ascentis Express Phenyl-Hexyl, 2,7 μm zakoupeno od společnosti SUPELCO (USA), PoroShell 12 Phenyl-Hexyl, 2,7 μm , Poroshell 120 EC, 2,7 μm , Cortecs +, 2,7 μm , Poroshell 120, 2,7 μm , zakoupeno od společnosti AGILENT (USA),. Všechny uvedené kolony měly rozměry 100 \times 4,6 mm. Ace 5 C18 250 \times 4,6 mm, 2,6 μm zakoupeno od společnosti ACT (Skotsko)

4.1.4 Kapalinové chromatografy

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s vysokotlakým čerpadlem G1311A QuatPump, odplyňovačem G1322A Degaser, autosamplerem G1329A ALS, termostatem G1316A Colcom, DAD detektorem G1315B DAD a software Empower 3 (USA). Druhý kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s vysokotlakým čerpadlem G1312A Binary pump, odplyňovačem G1322A Degaser, autosamplerem G1313A ALS, termostatem G1316A Colcom, DAD detektorem G13114 UV a software Empower 3 (USA).

4.2 Esomeprazol

4.2.1 HPLC metoda stanovení čistoty esomeprazolu

Metodu na stanovení čistoty esomeprazolu, která byla použita jako první, jsem převzal od společnosti Zentiva k.s. V této metodě je použita kolona Xbridge BEH C8 100 × 4,6 mm, 2,5 µm. Mobilní fáze v této metodě je složka A a složka B dle gradientového programu. Složkou A je 10 mmol/l pufr octanu amonného o pH 7,4. Složkou B je acetonitril o HPLC čistotě. Gradientový program je uveden v **Tab. 2**. Průtok mobilní fáze chromatografickým systémem je 0,8 ml/min. Objem nástřiku vzorku je 4 µl. Teplota na koloně je 30 °C a teplota autosampleru je 5 °C. Solventem pro přípravu vzorku je směs roztoku NaOH o koncentraci 0,01 mol/l a acetonitrilu v poměru 60/40 (v/v). Detekce esomeprazolu se provádí při vlnové délce 300 nm.

Tab. 2 Gradientový program stanovení čistoty esomeprazolu.

Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	87	13
12,5	30	70
13,5	87	13
18	87	13

4.2.2 Optimalizovaná metoda stanovení čistoty esomeprazolu

V optimalizované metodě je použita kolona Ascentis Express C18 100 × 4,6 mm, 2,7 μm. Mobilní fáze v této metodě je složka A a složka B dle gradientového programu. Složkou A je 10 mmol/l pufr octanu amonného o pH 7,4. Složkou B je acetonitril o HPLC čistotě. Gradientový program je uveden v **Tab. 3**. Průtok mobilní fáze chromatografickým systémem je 0,8 ml/min. Objem nástřiku vzorku je 4 μl. Teplota na koloně je 20 °C a teplota autosampleru je 5 °C. Solventem pro přípravu vzorku je směs roztoku NaOH o koncentraci 0,01 mol/l a acetonitrilu v poměru 60/40 (v/v). Detekce esomeprazolu se provádí při vlnové délce 300 nm.

Tab. 3 Gradientový program optimalizované metody stanovení čistoty esomeprazolu.

Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	87	13
12,5	30	70
13,5	87	13
18	87	13

4.3 Bisoprolol

4.3.1 Metoda stanovení čistoty bisoprololu

Metoda na stanovení čistoty bisoprololu, která byla použita pro vytvoření systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu byla převzata z Britského lékopisu⁵⁰. Jako kolona je použita ACE 5 C18 250 × 4,6 mm, 5 µm. Mobilní fáze v této metodě je složka A a složka B dle gradientového programu. Složkou A mobilní fáze je roztok kyseliny fosforečné o koncentraci 0,1 mol/l. Složkou B mobilní fáze je roztok kyseliny fosforečné v acetonitrilu o koncentraci 0,1 mol/l. Gradientový program je uveden v **Tab. 4**. Průtok mobilní fáze chromatografickým systémem je 1 ml/min. Teplota kolony a autosampleru je 20 °C. Objem nástřiku vzorku je 5,0 µl. Detekce bisoprololu a jeho nečistot je prováděna při vlnové délce 225 nm. Detekce nečistoty K je prováděna při vlnové délce 257 nm. Solventem pro rozpuštění vzorku je 20 % roztok acetonitrilu ve vodě.

Tab. 4 Gradientový program stanovení čistoty bisoprololu.

Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	95	5
4	95	5
8	80	20
15	80	20
34	20	80
36	20	80
37	95	5
45	95	5

4.3.2 Optimalizovaná metody stanovení čistoty bisoprololu

V optimalizované metodě je použita kolona Kinetex Phenyl-hexyl 100 × 4,6 mm, 2,6 µm. Mobilní fází v této optimalizované metodě je složka A a složka B dle gradientového programu. Složkou A je 10 mM roztok $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ o pH 1,0 a jako složka B acetonitril. Gradientový program je uveden v **Tab. 5**. Průtok mobilní fáze chromatografickým systémem je 1 ml/min. Teplota kolony a autosampleru je 20 °C. Objem nástřiku vzorku je 5,0 µl. Detekce bisoprololu a jeho nečistot je prováděna při vlnové délce 225 nm. Detekce nečistoty K je prováděna při vlnové délce 257 nm. Solventem pro rozpuštění vzorku je 20 % roztok acetonitrilu ve vodě.

Tab. 5 Gradientový program optimalizované metody stanovení čistoty bisoprololu.

Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	95	5
1,5	95	5
3	80	20
6	80	20
13,5	20	80
14,5	20	80
15	95	5
18	95	5

4.4 Risperidon

4.4.1 Metoda stanovení čistoty risperidonu

Metoda na stanovení čistoty risperidonu byla použita na ověření funkčnosti vytvořeného systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu. Tato metoda byla převzata z českého lékopisu 2009²⁹. Jako kolona je použita C18 100 × 4,6 mm, 3 μm. Mobilní fáze v této metodě je složka A a složka B dle gradientového programu. Složkou A mobilní fáze je roztok octanu amonného o koncentraci 5 g/l. Složkou B mobilní fáze je methanol o HPLC čistotě. Gradientový program je uveden v **Tab. 6**. Průtok mobilní fáze chromatografickým systémem je 1,5 ml/min. Teplota kolony a autosampleru je 20 °C. Objem nástriku vzorku je 10,0 μl. Detekce risperidonu a jeho nečistot je prováděna při vlnové délce 260 nm. Solventem pro rozpuštění vzorku je 50 % roztok methanolu ve vodě.

Tab. 6 Gradientový program stanovení čistoty risperidonu.

Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	70	70
2	70	70
17	30	70
22	30	70
23	70	30
27	70	30

4.4.2 Optimalizovaná metoda stanovení čistoty risperidonu

V optimalizované metodě na stanovení čistoty risperidonu byla použita kolona Ascentis Express C18 100 × 4,6 mm, 2,7 µm. Mobilní fáze v této metodě je složka A a složka B dle gradientového programu. Složkou A mobilní fáze je 10 mM roztok octanu amonného o pH 5,8. Složkou B mobilní fáze je methanol o HPLC čistotě. Gradientový program je uveden v **Tab. 7**. Průtok mobilní fáze chromatografickým systémem je 1,5 ml/min. Teplota kolony a autosampleru je 30 °C. Objem nástřiku vzorku je 10,0 µl. Detekce risperidonu a jeho nečistot je prováděna při vlnové délce 260 nm. Solventem pro rozpuštění vzorku je 50 % roztok methanolu ve vodě.

Tab. 7 Gradientový program optimalizované metody stanovení čistoty risperidonu.

Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	70	70
2	70	70
17	30	70
22	30	70
23	70	30
27	70	30

5 Výsledky a diskuse

5.1 Vývoj systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí přístupu DoE

V první fázi vývoje systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE jsem vytvořil kostru tohoto systému. Systematický postup jsem rozdělil do čtyř částí: fáze příprav, DoE, vyhodnocení DoE a fáze po DoE. Do fáze příprav jsem zahrnul řešerši o stanovované látce a jejích vlastnostech. Ve fázi DoE se volí vhodný statistický model, závisle a nezávisle proměnné, vytváří se pracovní list a provádí chromatografické experimenty. V části vyhodnocení DoE se statisticky analyzují získaná data z vyhodnocených experimentů z pracovního listu. Při poslední fázi se testuje výsledná HPLC metoda a provádí screening kolon.

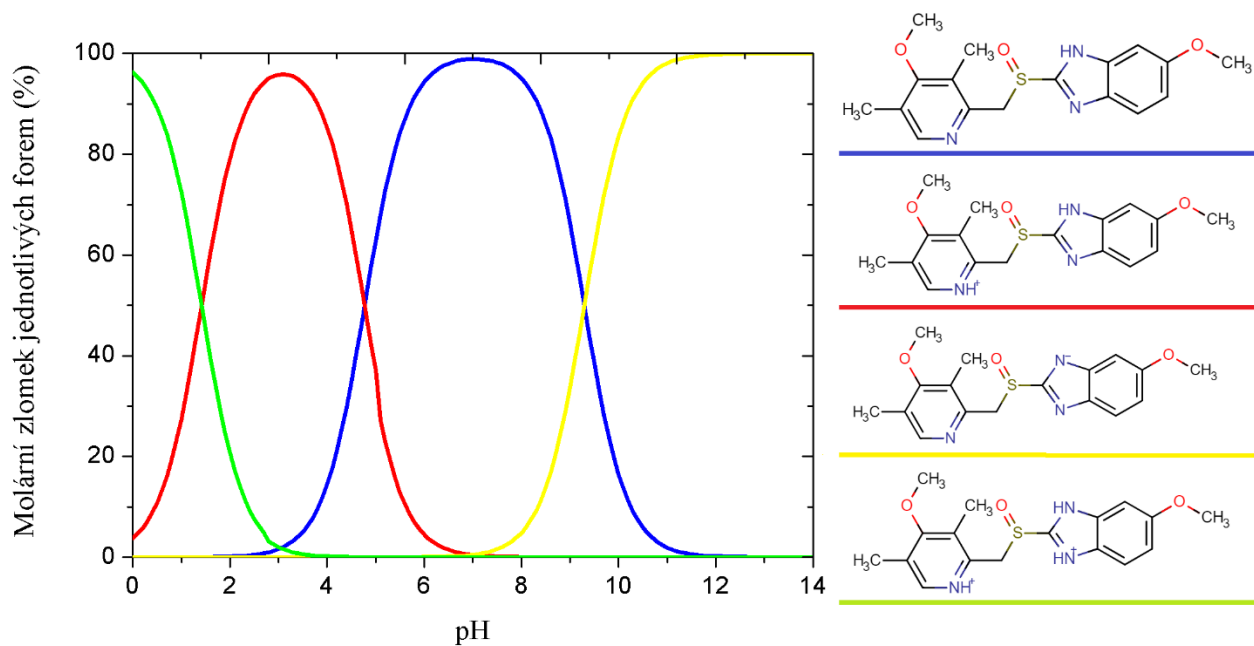
5.2 Esomeprazol

5.2.1 Cíle

Cílem práce s metodou na stanovení čistoty esomeprazolu bylo zmapování experimentálního prostoru, nalezení nejvhodnějších podmínek separace a získání informací a zkušeností k tvoření systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí přístupu DoE.

5.2.2 Volba nezávisle proměnných

Na základě informací získaných o esomeprazolu a metody převzaté od společnosti Zentiva k.s. jsem zvolil tyto nezávisle proměnné. Za kvalitativní nezávisle proměnné byly zvoleny typ stacionární fáze a organická složka mobilní fáze. Za kvantitativní nezávisle proměnné byly zvoleny pH a teplota na koloně. Jako typy stacionární fáze byly zvoleny C8, Phenyl-hexyl a F5. Za organické složky mobilní fáze byly zvoleny acetonitril a methanol. Na základě informací z distribučního diagramu⁵¹, **Obr. 8**, bylo zvoleno rozmezí pH mezi 6,8-8,0 jelikož se v tomto pH nachází neionizovaná forma esomeprazolu. Teplota na koloně byla zvolena v rozmezí 20-40 °C, což je ± 10 °C oproti převzaté metodě. Přehled zvolených nezávisle proměnných a jejich hodnot je uveden v **Tab. 8**.



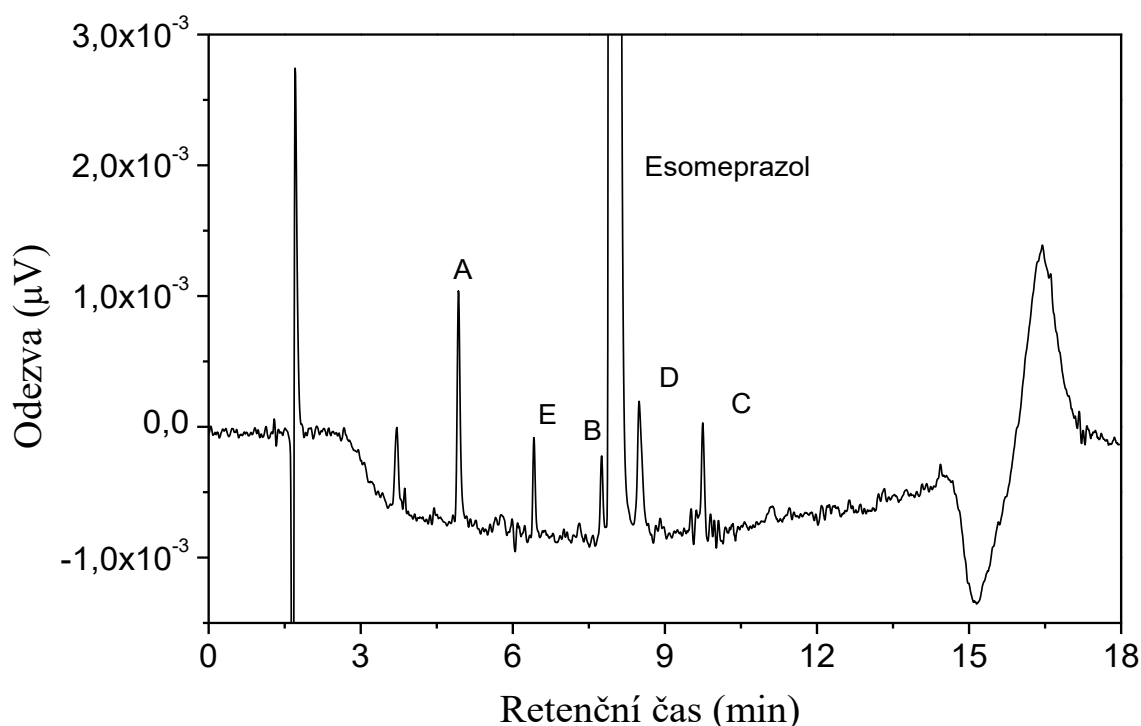
Obr. 8 Distribuční diagram esomeprazolu. (převzato⁵¹).

Tab. 8 Přehled zvolených nezávisle proměnných.

Název nezávisle proměnné	Hodnota faktoru
pH	6,8; 7,4; 8,0
Stacionární fáze	C8, F5, Phenyl-hexyl
Teplota (°C)	20; 30; 40
Organická složka MF	acetonitril, methanol

5.2.3 Volba závisle proměnných

Z hodnot získaných vyhodnocením chromatogramu původní metody, **Obr. 9**, byly za závisle proměnné zvoleny, rozlišení jednotlivých píků, USP tailing píku esomeprazolu. Jako vhodnější parametr pro rozlišení mezi nízkým a vysokým píkem byl zvolen diskriminační faktory B-Esomeprazol a esomeprazol-D. Dalším sledovaným parametrem byla centrální pozice nečistoty D. Tento parametr byl sledován z důvodu sledování pohybu nečistoty D od nebo k píku esomeprazolu.



Obr. 9 Chromatogram stanovení čistoty esomeprazolu pomocí původní metody.

(Kolona Xbridge BEH C8 100 x 4,6 mm; 2,5 μm)

5.2.4 Plán experimentů

V software Modde 12 byl zvolen statistický lineární Taguchiho L18 model. Do software byly zadány nezávisle proměnné se zvolenými úrovněmi. Následně byl vygenerován pracovní list 21 experimentů kombinující nezávisle proměnné. Těchto 21 experimentů je potřebných k prozkoumání experimentálního prostoru. Vygenerovaný pracovní list je uveden v **Tab. 9**. Experimenty N19-N21 jsou výchozími body. V našem případě se jedná o chromatografické podmínky převzaté z metody na stanovení čistoty esomeprazolu od

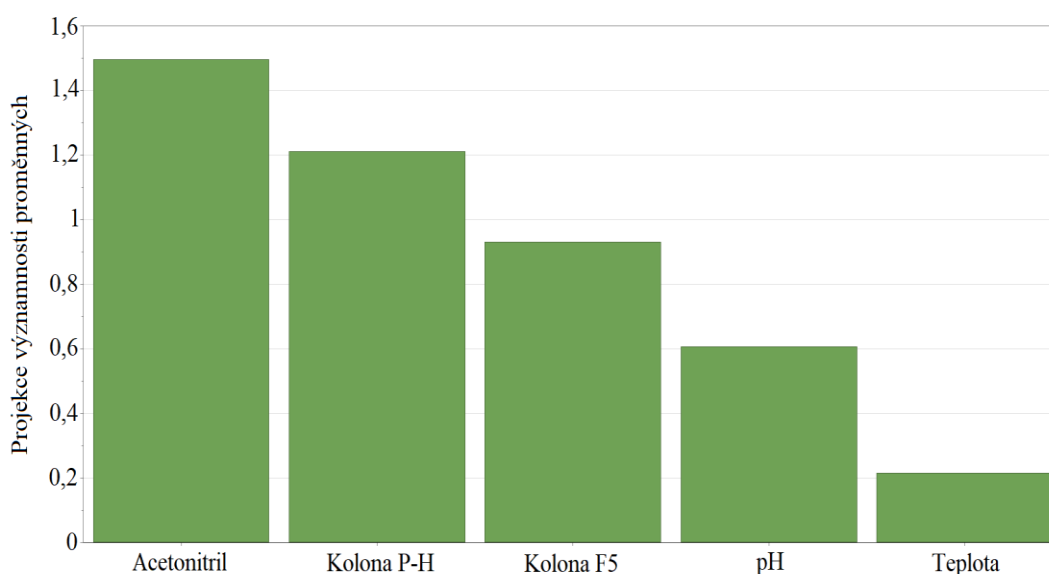
společnosti Zentiva k.s. Ke stanovení byl použit roztok se standardním přídatkemesomeprazolu o koncentraci 1 mg/ml a koncentraci nečistot 0,05 %.

Tab. 9 Vygenerovaný pracovní list pro prozkoumání experimentálního prostoru ve stanoveném okolí metody na stanovení čistoty esomeprazolu.

Označení experimentu	Kolona	Organická složka	Teplota (°C)	pH
N1	C8	MeOH	20	6,8
N2	C8	MeOH	30	7,4
N3	C8	MeOH	40	8,0
N4	F5	MeOH	20	6,8
N5	F5	MeOH	30	7,4
N6	F5	MeOH	40	8,0
N7	Phenyl-hexyl	MeOH	20	7,4
N8	Phenyl-hexyl	MeOH	30	8,0
N9	Phenyl-hexyl	MeOH	40	6,8
N10	C8	AcN	20	8,0
N11	C8	AcN	30	6,8
N12	C8	AcN	40	7,4
N13	F5	AcN	20	7,4
N14	F5	AcN	30	8,0
N15	F5	AcN	40	6,8
N16	Phenyl-hexyl	AcN	20	8,0
N17	Phenyl-hexyl	AcN	30	6,8
N18	Phenyl-hexyl	AcN	40	7,4
N19	C8	AcN	30	7,4
N20	C8	AcN	30	7,4
N21	C8	AcN	30	7,4

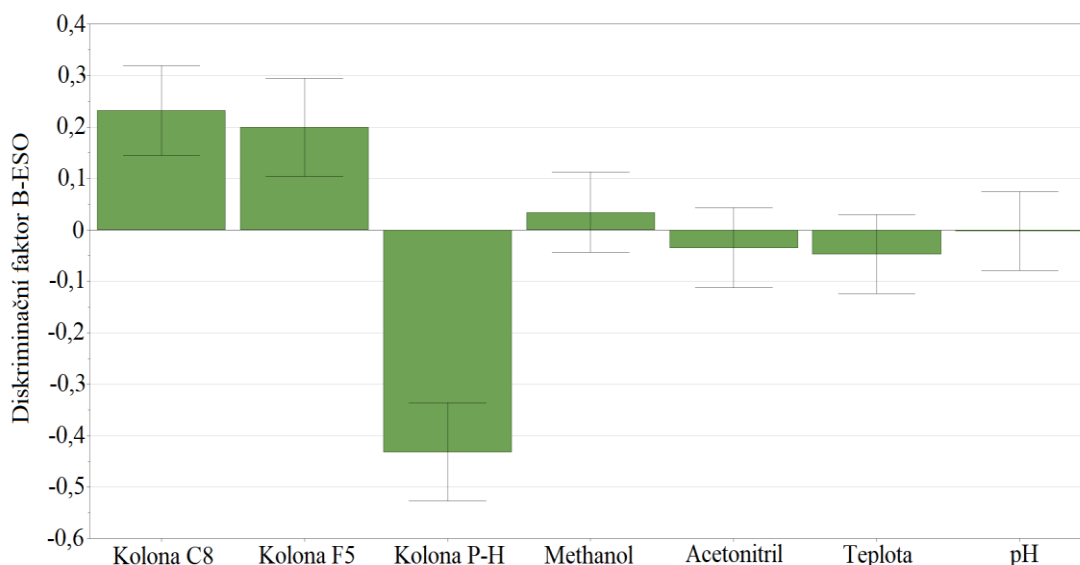
5.2.5 Vyhodnocení design of experiments

Po vyhodnocení všech chromatogramů byla data zpracována v software Modde 12 metodou částečných nejmenších čtverců. V prvním kroku jsem se získanými daty pracoval jako s celkem a zobrazil je projekcí významnosti proměnných, která nám sděluje informace, jaké nezávisle proměnné mají nejvýznamnější vliv na experimentální prostor, **Obr. 10**. Z grafu můžeme vyvodit, že nejvýznamněji experimentální prostor ovlivňuje acetonitril jako organická složka mobilní fáze a kolona Phenyl-hexyl.



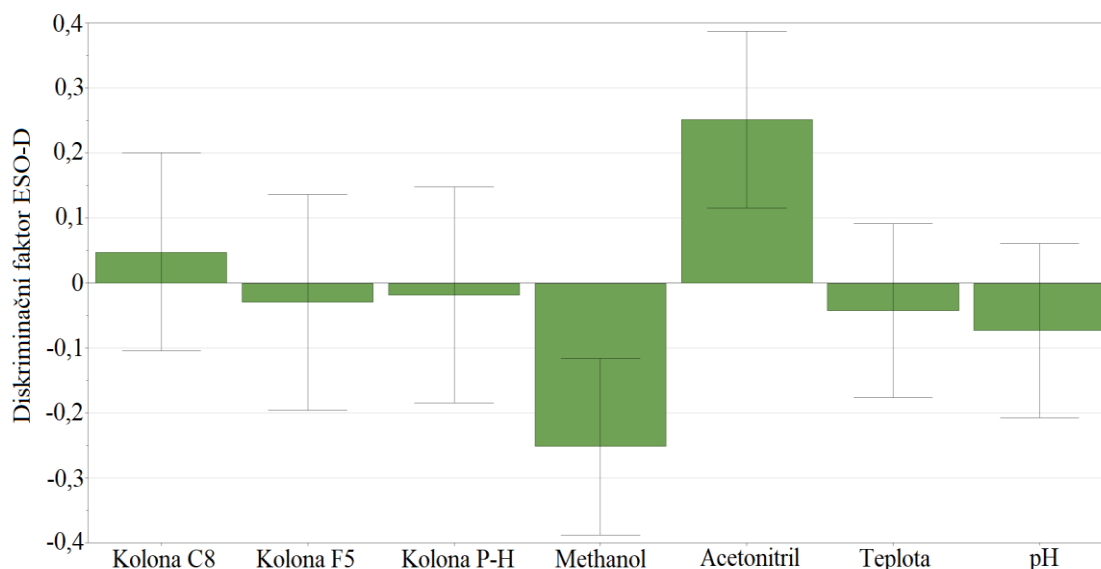
Obr. 10 Projekce významnosti proměnných experimentálního prostoru HPLC metody na stanovení čistoty esomeprazolu.

Jako méně významný faktor byla vyhodnocena kolona F5. Zbylé faktory, jako na grafu zobrazené pH a teplota byli vyhodnoceny jako statisticky nevýznamné. Jelikož byly všechny píky kromě nečistot B, D a hlavního píku esomeprazolu vždy zcela separovány, rozlišení zcela separovaných nečistot nebylo dále statisticky hodnoceno. U nečistot B, D a hlavního píku byla jejich separace vyhodnocena jako diskriminační faktory nečistoty B od esomeprazolu a esomeprazolu od nečistoty D. Pro vyhodnocení nezávisle proměnných, které mají vliv na diskriminační faktor B od esomeprazolu (B-ESO) a esomeprazolu od nečistoty D (ESO-D) byl použit graf koeficientů, **Obr 11, 12**.



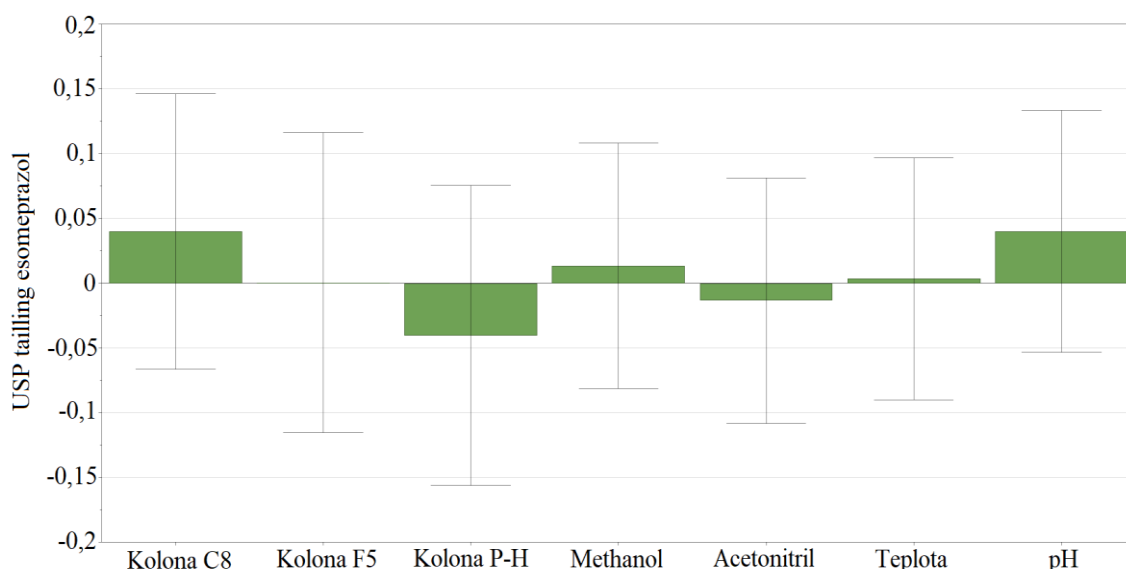
Obr. 11 Graf koeficientů pro diskriminační faktor B-ESO.

Z grafu koeficientů na **Obr. 11** je patrné, že negativní vliv na hodnotu diskriminačního faktoru nečistoty B-ESO má kolona Pheny-hexyl. Pozitivní vliv na hodnotu diskriminačního faktoru mají kolony C8 a F5. Ostatní nezávisle proměnné neovlivňovaly diskriminační faktor nečistoty B-ESO statisticky významně.



Obr. 12 Graf koeficientů pro diskriminační faktor ESO-D.

Pro diskriminační faktor ESO-D lze prohlásit na základě grafu koeficientů, **Obr. 12**, že statisticky významný vliv na jeho hodnotu mají pouze organické složky mobilní fáze, a to acetonitril pozitivní a methanol negativní. Jako další parametr byl vyhodnocován USP tailing hlavního píku esomeprazolu Z grafu koeficientů pro tento parametr je vidět, že žádná nezávisle proměnná nemá na USP tailing jakýkoliv statisticky významný vliv, **Obr. 13**.



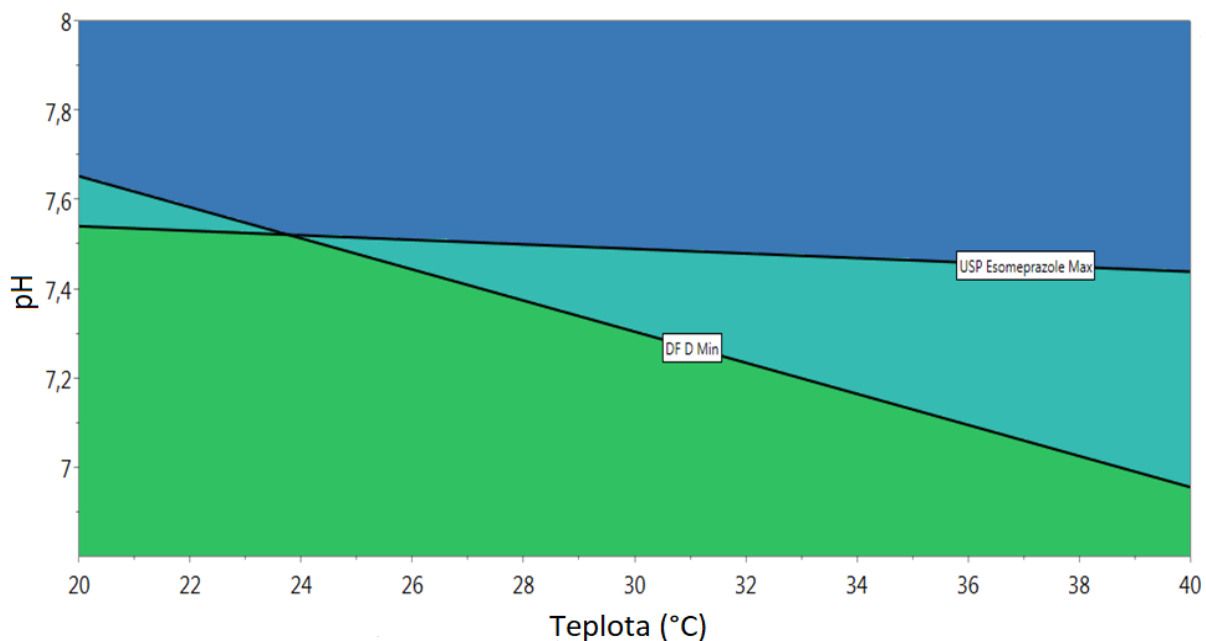
Obr. 13 Graf koeficientů pro USP tailing hlavního píku esomeprazolu.

V dalším kroku byla data zobrazena pomocí nástroje sweet spot, kde jsem za konstantní parametry zvolil acetonitril jako organickou složku mobilní fáze a jednotlivé typy stacionární fáze. Dále byly zvoleny limity vybraných závisle proměnných. Závisle proměnné a jejich limity jsou uvedeny v **Tab. 10**.

Tab. 10 Závisle proměnné a jejich limity zvolené pro nástroj sweet spot plot.

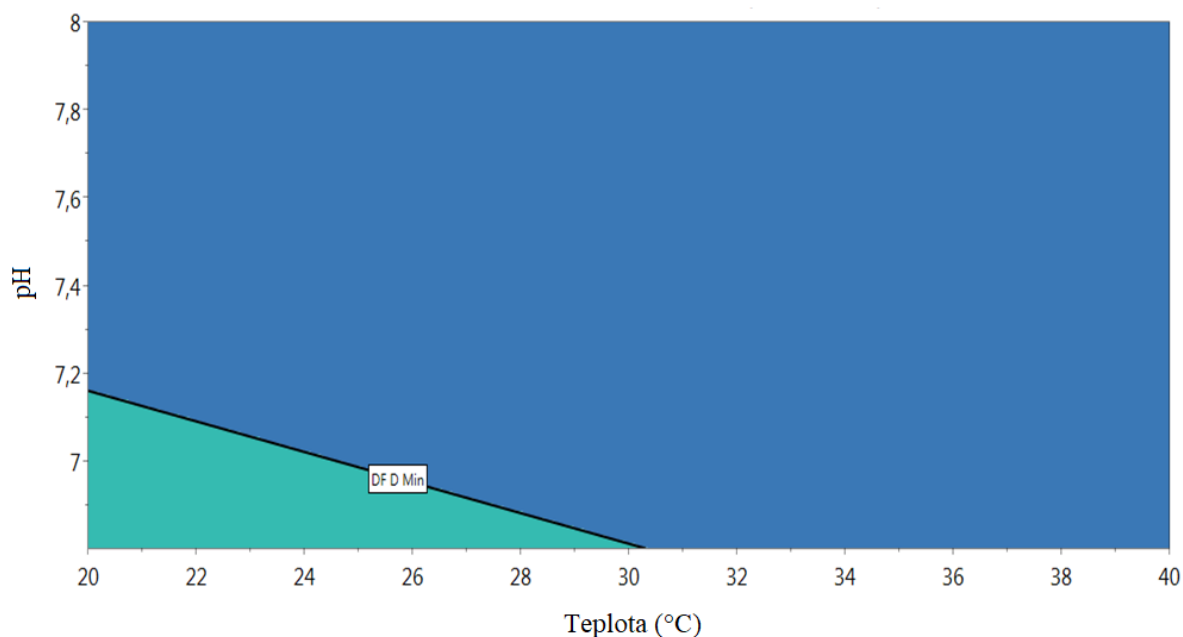
Závisle proměnná	Minimum	Cíl
USP tailing esomeprazolu	0,8	1,25
Diskriminační faktor B-ESO	0,8	1
Diskriminační faktor ESO-D	0,8	1
Centrální pozice nečistoty D	0,165	-

Na **Obr. 14** je zobrazen sweet spot plot, u kterého jsou konstantními parametry stacionární fáze C8 a acetonitril jako organická složka mobilní fáze. Je zde možné pozorovat robustní oblast v rozmezí teploty 20-40 °C a pH od 7,0 -7,4. To značí, že v tomto rozmezí, chromatografických podmínek budou vždy 3 ze 4 parametrů uvedených v **Tab. 10** splněny. Oproti tomu v rozmezí pH 7,6-8,0 bude vždy splněn pouze 1 ze 4 parametrů. Z toho vyplývá, že nejvhodnější část experimentálního prostoru pro separaci esomeprazolu a jeho nečistot je na **Obr. 14** vyznačena zeleně.



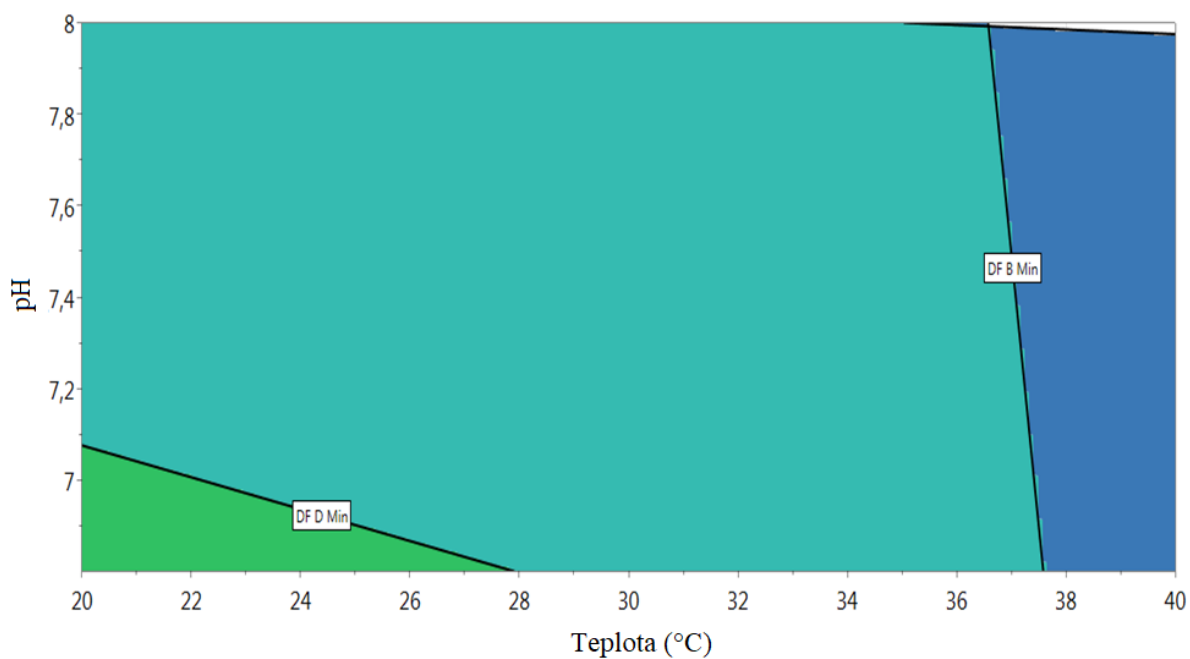
Obr. 14 Sweet spot plot znázorňující experimentální prostor za konstantní stacionární fáze (C8) a organické složky mobilní fáze (acetonitril). Zelená barva znamená splnění 3 ze 4 parametrů, tyrkysová barva značí splnění 2 ze 4 parametrů a tmavě modrá značí oblast ve které je splněn jen 1 ze 4 parametrů.

Pro další vizualizaci experimentálního prostoru byly za konstantní zvoleny stacionární fáze Phenyl-hexyl a acetonitril jako organická složka mobilní fáze. Tato vizualizace experimentálního prostoru je zobrazena na **Obr. 15**. Zde je vidět, že v téměř celém experimentálním prostoru bude splněn pouze 1 ze 4 parametrů.



Obr. 15 Sweet spot plot znázorňující experimentální prostor za konstantní stacionární fáze (P-H) a organické složky mobilní fáze (acetonitril). Tyrkysová barva značí splnění 2 ze 4 parametrů a tmavě modrá značí oblast ve které je splněn jen 1 ze 4 parametrů.

V poslední vizualizaci experimentálního prostoru pomocí nástroje sweet spot plot byly za konstantní parametry zvoleny stacionární fáze F5 a acetonitril jako organická složka mobilní fáze. Z **Obr. 16**, na kterém je zobrazen sweet spot plot, můžeme vidět malou část experimentálního prostoru v rozmezí pH 6,8-7,0 a teploty 20-26 °C, kde jsou splněny 3 ze 4 parametrů. Oproti tomu zbylá část experimentálního prostoru splňuje pouze 1-2 splněné parametry ze 4.



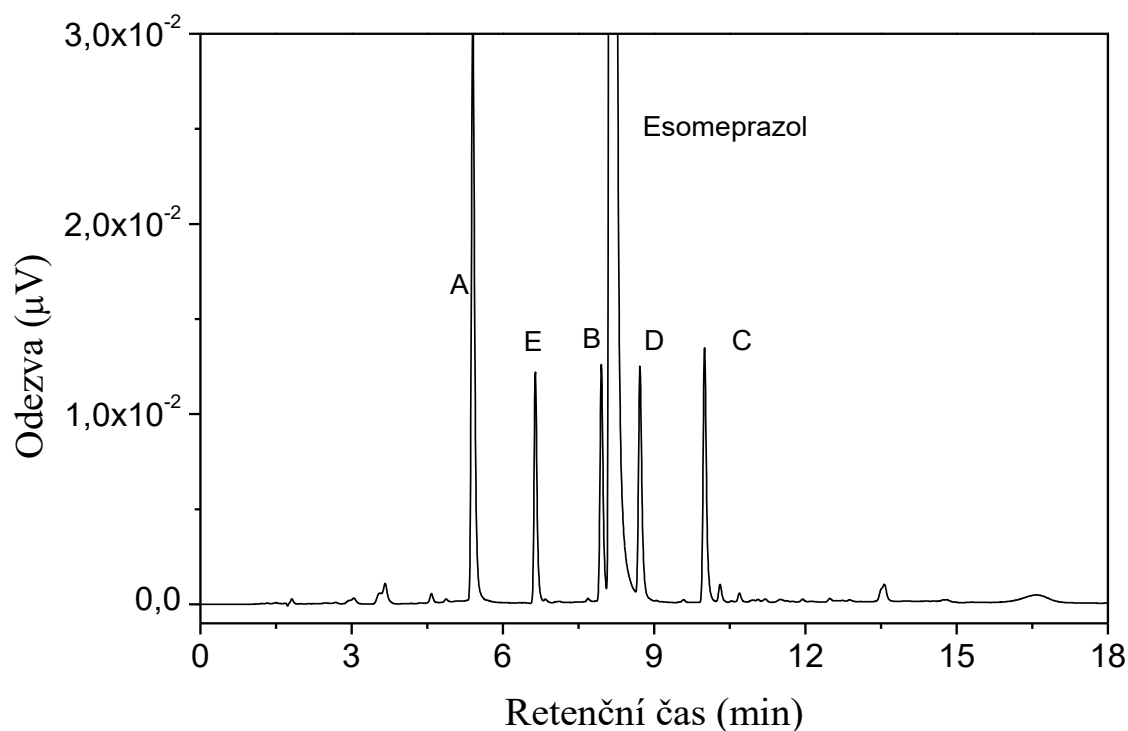
Obr. 16 Sweet spot plot znázorňující experimentální prostor za konstantní stacionární fáze (F5) a organické složky mobilní fáze (acetonitril). Zelená barva znamená splnění 3 ze 4 parametrů, tyrkysová barva značí splnění 2 ze 4 parametrů a tmavě modrá značí oblast ve které je splněn jen 1 ze 4 parametrů.

V posledním kroku vyhodnocení pomocí přístupu DoE byl použit nástroj optimalizér, který ze získaných dat a zadaných limitů zvolených závisle proměnných matematicky vypočítá nejlepší chromatografické podmínky pro nejlepší separaci. Hodnoty limitů zvolených chromatografických parametrů jsou uvedeny v **Tab. 11**.

Tab. 11 Závisle proměnné a jejich limity zvolené pro nástroj optimalizér.

Parametr	Minimum	Cíl	Maximum
Rozlišení B-ESO	2	3	-
Rozlišení ESO-D	2	3	-
USP Tailing esomeprazolu	0,8	1	1,2
Diskriminační faktor B-ESO	0,8	1	-
Diskriminační faktor ESO-D	0,8	1	-
Centrální pozice nečistoty D	0,165	1	-

Jako nejvhodnější podmínky pro separaci byly vypočítány: pH 7,4; teplota 20 °C; stacionární fáze C8 a jako organická složka mobilní fáze byl vypočten acetonitril. Chromatogram stanovení čistoty esomeprazolu za těchto vypočtených podmínek je zobrazen na **Obr. 17**.



Obr. 17 Chromatogram stanovení čistoty esomeprazolu za vypočtených podmínek pomocí nástroje optimalizér. (Kolona Xbridge BEH C8 100 × 4,6 mm; 2,5 µm)

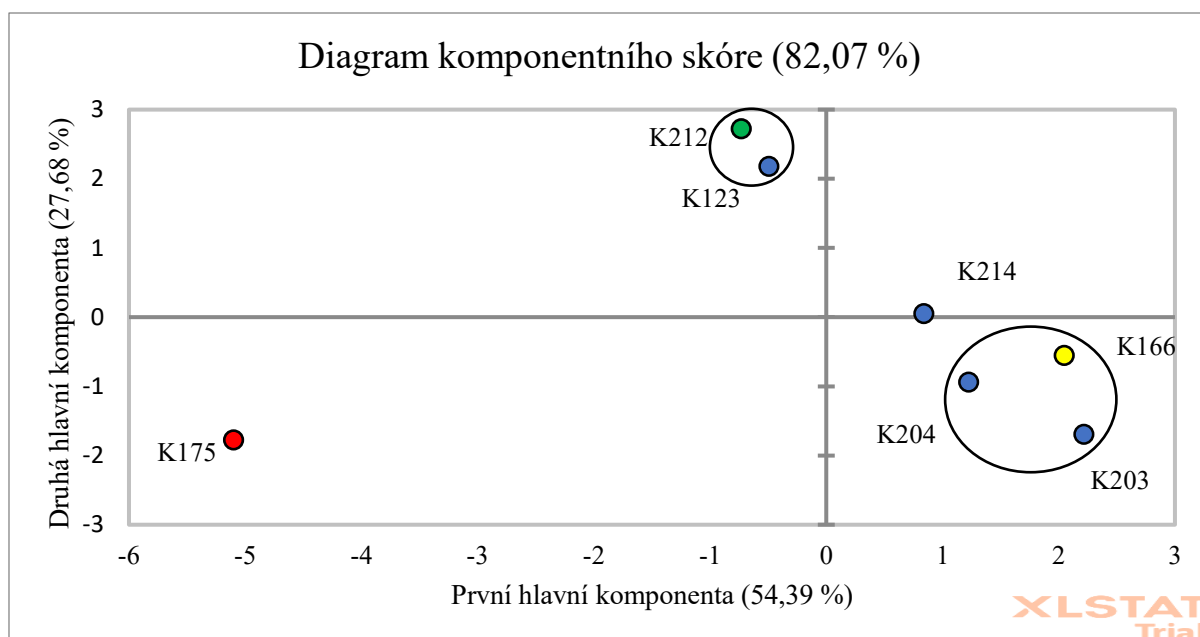
5.2.6 Vyhodnocení screeningu kolon

Při screeningu kolon pro HPLC stanovení čistoty esomeprazolu byly zahrnuty kolony se stacionárními fázemi C8 a C18. Jejich přehled je uveden v **Tab. 12**. Všechna stanovení byla provedena za podmínek vypočítaných nástrojem optimalizér.

Tab. 12 Přehled kolon použitých pro screening kolon pro stanovení čistoty esomeprazolu.

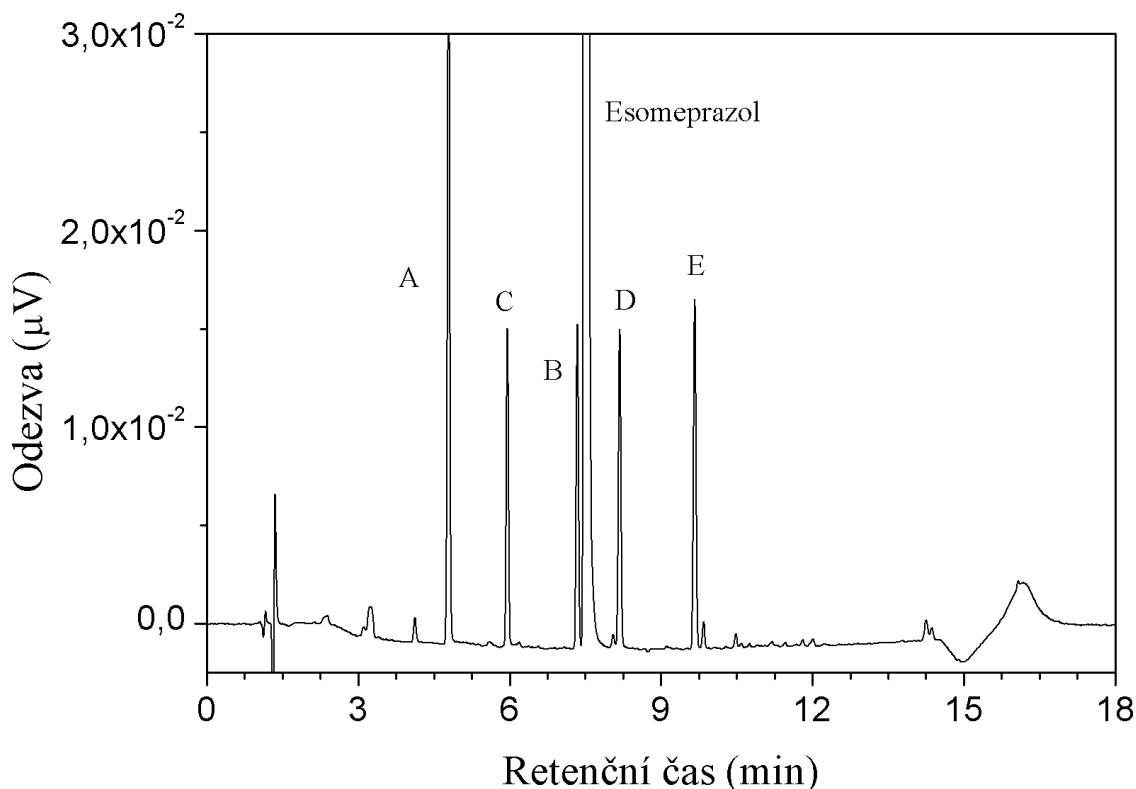
Kód kolony	Název kolony	Velikost částic (μm)	Typ sorbentu	Povrch	Technologie částic
K212	Xbridge BEH C8	2,5	Hybridní	Nenabitý	Plně porézní
K123	Poroshell 120 EC C8	2,7	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K214	Kinetex C8	2,6	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K166	Ascentis Express C18	2,7	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K175	Xbridge BEH Shield RP 18	2,5	Hybridní	Nenabitý	Pevné jádro
K203	Kinetex C18	2,6	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K204	Kinetex polar C18	2,6	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro

U všech chromatogramů ,které byly naměřeny v rámci screeningu kolon byly vyhodnoceny tyto chromatografické parametry: rozlišení jednotlivých píků, diskriminační faktory nečistot B a D v okolí hlavního píku a USP tailing hlavního píku esomeprazolu. Data získaná z chromatogramů byla vyhodnocena pomocí analýzy hlavních komponent a zobrazena na diagramu komponentního skóre, **Obr. 18**. Na diagramu můžeme pozorovat shluk dvou bodů, K212, který značí kolonu použitou při vývoji HPLC metody pomocí přístupu DoE, a K123. Tyto dvě kolony měly podobné hodnoty vyhodnocovaných statistických parametrů, což je způsobeno tím, že obě kolony mají stejný typ stacionární fáze, tedy C8. Obě tyto kolony splňují minimální hodnoty chromatografických parametrů zvolených pro nástroj optimalizér, kromě parametru centrální pozice nečistoty D, který nebyl splněn v žádném z případů, proto je možné použít pro HPLC stanovení čistoty esomeprazolu obě kolony. Pro kolony K166, K204 a K203.



Obr. 18 Diagram komponentního skóre screeningu kolon pro stanovení čistoty esomeprazolu.

nacházející se ve druhém shluku je společným znakem to, že všechny kolony mají stacionární fázi C18, jsou vyrobeny technologií pevného jádra a mají silikagelový základ. Tyto podobnosti byly statisticky prokázány, jelikož u všech těchto kolon měly chromatografické parametry podobné hodnoty a u kolony K166 byly hodnoty chromatografických parametrů lepší než u původní kolony K212. Na základě těchto poznatků je k HPLC stanovení možno použít jakoukoliv z výše zmíněných kolon. Oproti tomu hybridní, plně porézní kolona K175 poskytovala nejhorší hodnoty sledovaných chromatografických parametrů, což bylo způsobeno zcela odlišnými vlastnostmi této kolony. Na **Obr. 19** je uveden chromatogram stanovení čistoty esomeprazolu na koloně K166 Ascentis Express C18, která vyšla ze screeningu kolon jako statisticky nejlepší.



Obr. 19 Chromatogram stanovení čistoty esomeprazolu za vypočtených podmínek pomocí nástroje optimalizér. (Kolona Ascentis Express C18 100 x 4,6 mm; 2,7 μm)

5.2.7 Diskuze esomeprazol

Cílem bylo prozkoumat experimentální prostor v okolí podmínek HPLC metody na stanovení čistoty esomeprazolu za účelem hledání výhodnějších podmínek separace. Experimentální prostor byl úspěšně zmapován a na základě mapování experimentálního prostoru změněna teplota na koloně ze 30 °C na 20 °C. Tato změna měla za následek zlepšení hodnot diskriminačních faktorů a centrální pozice nečistoty D, což znamenalo zlepšení separace nečistot B a D a píku esomeprazolu. Dále bylo zjištěno, že na symetrii píku sledovanou pomocí parametrů USP tailing nemá vliv žádná ze studovaných nezávisle proměnných. Nepodařilo se nalézt vhodnější podmínky pro stanovení čistoty esomeprazolu, ale byly získány zkušenosti pro vývoj systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE. Při screeningu kolon bylo statisticky zjištěno, že pro provedení HPLC stanovení čistoty esomeprazolu je možno použít 5 různých kolon, aniž byly negativně ovlivněny výkonnostní parametry metody.

5.3 Bisoprolol

5.3.1 Cíle

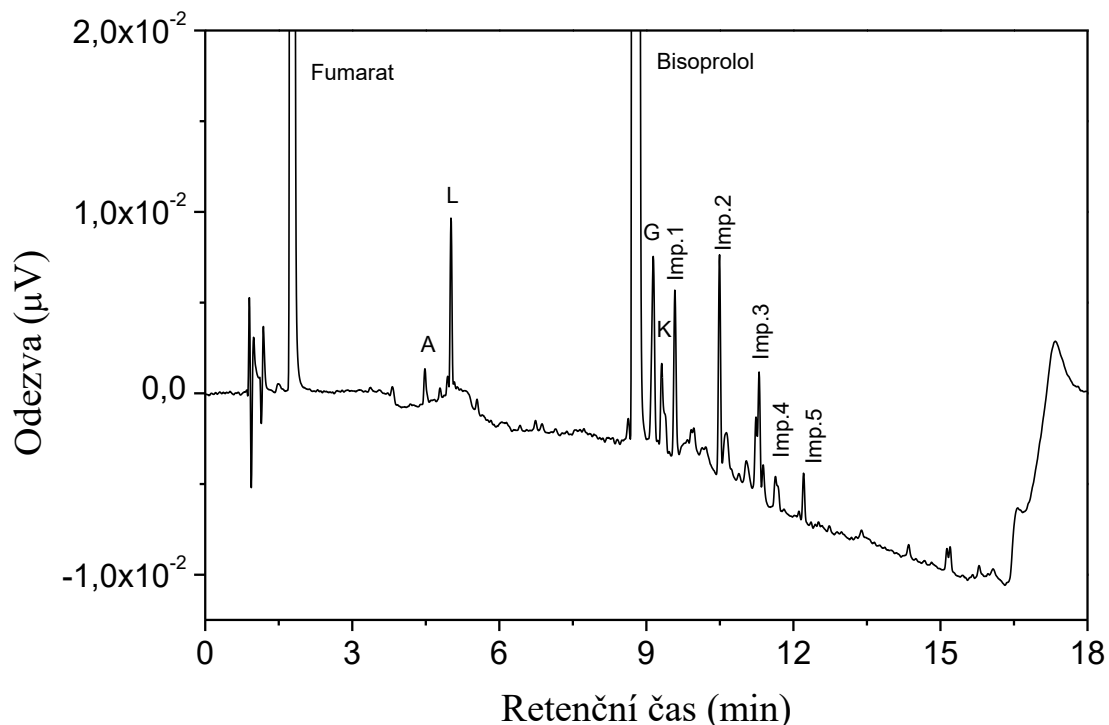
Hlavním cílem bylo aplikovat vylepšený systematický postup pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE. Dalším cílem bylo prozkoumat experimentální prostor za účelem nalezení vhodnějších podmínek k lepší separaci klastru nečistot za hlavním píkem bisoprololu. Dílčími cíli byla změna mobilní fáze, použití pufru a převedení lékopisné metody na stanovení čistoty bisoprololu na kratší kolonu s menší velikostí částic za účelem zkrácení doby analýzy.

5.3.2 Převod a úprava metody

Hodnota pH roztoku použitého jako mobilní fáze u lékopisné metody byla stanovena na 0,83, což je pod hodnotou doporučeného pH téměř všech komerčně dostupných kolon. A proto byl zvolen za mobilní fázi 10 mM roztok $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ o pH 2,0. Metoda byla převedena na kolonu menších rozměrů pomocí webové aplikace Thermo Scientific Method transfer recommendations⁵². Shrnutí převodu je uvedeno v **Tab. 12**. Výsledná převedená metoda byla sloužila k dalším experimentům a sloužila jako výchozí pro DoE. Chromatogram převedené metody je zobrazen na **Obr. 20**. K měření byl použit stresovaný vzorek bisoprololu (28 dní; 60 °C; 30 % RH) o koncentraci 1 mg/ml.

Tab. 12 Shrnutí převodu HPLC metody na kratší kolonu pomocí webové aplikace Thermo Scientific Method transfer recommendations⁵².

Lékopisná metoda			Převedená metoda		
Kolona			Kolona		
Délka	250	mm	Délka	100	mm
Průměr	4,6	mm	Průměr	4,6	mm
Velikost částic	5,0	μm	Velikost částic	2,6	μm
Podmínky metody			Podmínky metody		
Průtok	1	ml/min	Průtok	1	ml/min
Objem nástřiku	10	μl	Objem nástřiku	5	μl
Gradientový program			Gradientový program		
Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)	Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	95	5	0	95	5
4	95	5	1,5	95	5
8	80	20	3	80	20
15	80	20	6	80	20
34	20	80	13,5	20	80
36	20	80	14,5	20	80
37	95	5	15	95	5
45	95	5	18	95	5



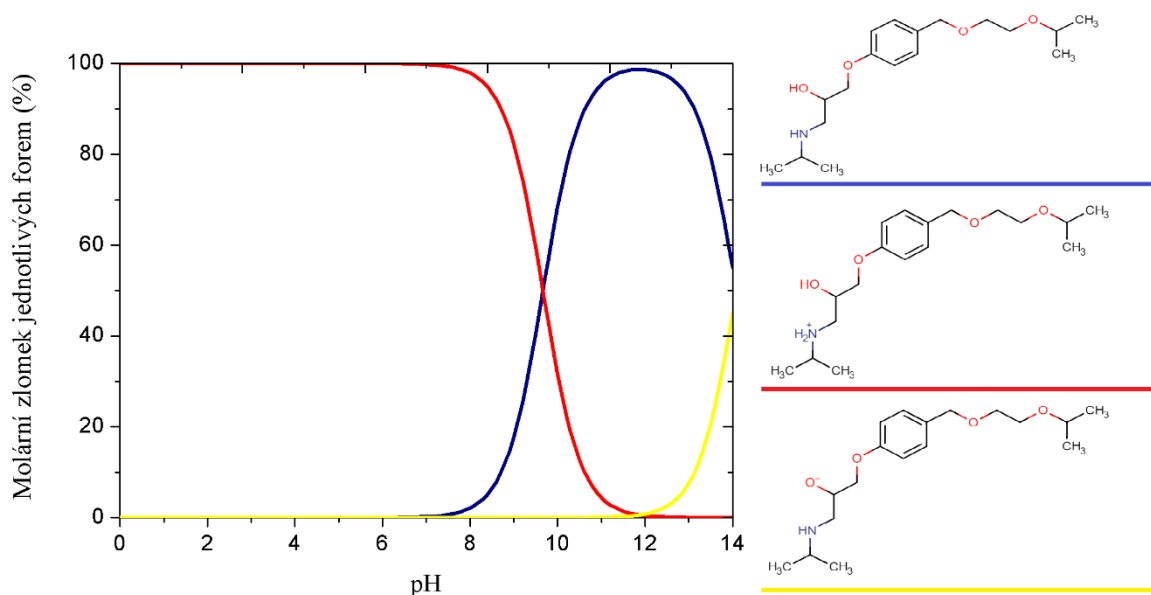
Obr. 20 Chromatogram separace stresovaného vzorku bisoprololu (60 °C;30 %RV;28 dní) pomocí převedené metody. (Kolona Kinetex C18 100 x 4,6 mm; 2,6 μm)

5.3.3 Volba nezávisle proměnných

Na základě získaných informací o bisoprololu a převedené metodě byly za kvantitativní nezávisle proměnné zvoleny teplota kolony v rozmezí 20-50 °C, aby bylo pokryto co největší rozmezí teplot a pH v rozmezí 1-3, což je oblast ve které pufruje fosforečnanový pufr. Z distribučního diagramu⁵³, **Obr. 21**, je také zřejmé, že se zde nachází forma bisoprololu vhodná k separaci. Jako kvalitativní nezávisle proměnné byly vybrány druh organické složky mobilní fáze, acetonitril/methanol, a druh stacionární fáze C18, F5 a Phenyl-hexyl. Přehled nezávisle proměnných je uveden v **Tab. 13**.

Tab. 13 Přehled zvolených nezávisle proměnných.

Název nezávisle proměnné	Hodnota proměnné
pH	1,0; 2,0; 3,0
Stacionární fáze	C8, F5, Phenyl-hexyl
Teplota (°C)	20; 35; 50
Organická složka MF	acetonitril, methanol



Obr. 21 Distribuční diagram bisoprolol hemifumarátu (převzato⁵³).

5.3.4 Volba závisle proměnných

Z chromatogramu převedené metody na stanovení čistoty bisoprololu, **Obr. 20**, a hodnot získaných jeho vyhodnocením byly za závisle proměnné zvoleny USP tailing hlavního píku bisoprololu, diskriminační faktor nečistoty G na chvostu hlavního píku bisoprololu, separační oblast, centrální pozice nečistoty K a rozlišení jednotlivých píků kromě rozlišení nečistoty G.

5.3.5 Plán experimentů

Pro vytvoření plánu experimentů byl použit Taguchiho L18 model v softwaru Modde 12. Plán experimentů obsahoval 21 experimentů. Experimenty N19-21 jsou centrální body, tedy výchozí body experimentálního prostoru. V případě metody stanovení bisoprolol hemifumarátu byly výchozími body chromatografické podmínky převedené metody. Při všech experimentech byl použit stresovaný vzorek bisoprololu (28 dní; 60 °C; 30 % RH) o koncentraci 1 mg/ml. Přehled naplánovaných experimentů je uveden v **Tab. 14**.

Tab. 14 Vygenerovaný pracovní list pro prozkoumání experimentálního prostoru ve stanoveném okolí metody na stanovení čistoty bisoprololu.

Označení experimentu	pH	Kolona	Organická složka MF	Teplota (°C)
N1	1,0	C18	AcN	20
N2	1,0	F5	AcN	35
N3	1,0	Phenyl-Hexyl	AcN	50
N4	2,0	C18	AcN	20
N5	2,0	F5	AcN	35
N6	2,0	Phenyl-Hexyl	AcN	50
N7	3,0	C18	AcN	35
N8	3,0	F5	AcN	50
N9	3,0	Phenyl-Hexyl	AcN	20
N10	1,0	C18	MeOH	50
N11	1,0	F5	MeOH	20
N12	1,0	Phenyl-Hexyl	MeOH	35
N13	2,0	C18	MeOH	35
N14	2,0	F5	MeOH	50
N15	2,0	Phenyl-Hexyl	MeOH	20
N16	3,0	C18	MeOH	50
N17	3,0	F5	MeOH	20
N18	3,0	Phenyl-Hexyl	MeOH	35
N19	1,0	C18	AcN	20
N20	1,0	C18	AcN	20
N21	1,0	C18	AcN	20

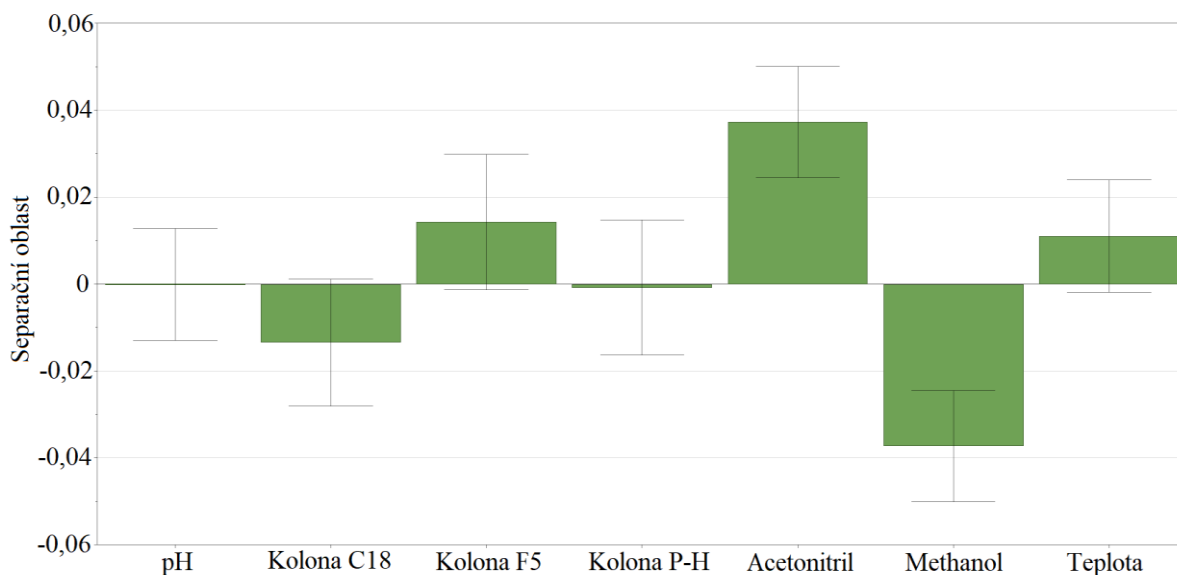
5.3.6 Vyhodnocení design of experiments

Po provedení všech 21 naplánovaných experimentů byla získaná data chromatografických parametrů statisticky zpracována metodou částečných nejmenších čtverců v software Modde 12. Výsledky byly nejprve vizualizovány pomocí projekce významnosti proměnných, **Obr. 22**. Z grafu můžeme vidět, že nejvíce je definovaný experimentální prostor ovlivňován methanolem coby organickou složkou mobilní fáze a stacionární fází F5. Méně významnou nezávisle proměnnou ovlivňující experimentální prostor je stacionární fází Phenyl-hexyl. Zbýlé dvě nezávisle proměnné teplota a pH zobrazené v grafu nemají na experimentální prostor statisticky významný vliv.



Obr. 22 Projekce významnosti proměnných experimentálního prostoru HPLC metody na stanovení čistoty bisoprololu.

Pro sledování shluku nečistot za hlavním píkem bisoprololu byl použit parametr separační oblast, jehož pomocí bylo sledováno kolik procent z celkové doby analýzy trvala separace tohoto shluku. Z grafu koeficientů pro separační oblast, **Obr. 23**, vyplývá, že pozitivní vliv, tedy zvyšování hodnoty separační oblasti měl acetonitril coby organická složka mobilní fáze. Oproti tomu měl methanol na tento parametr negativní vliv.



Obr. 23 Graf koeficientů pro separační oblast stanovení čistoty bisoprololu.

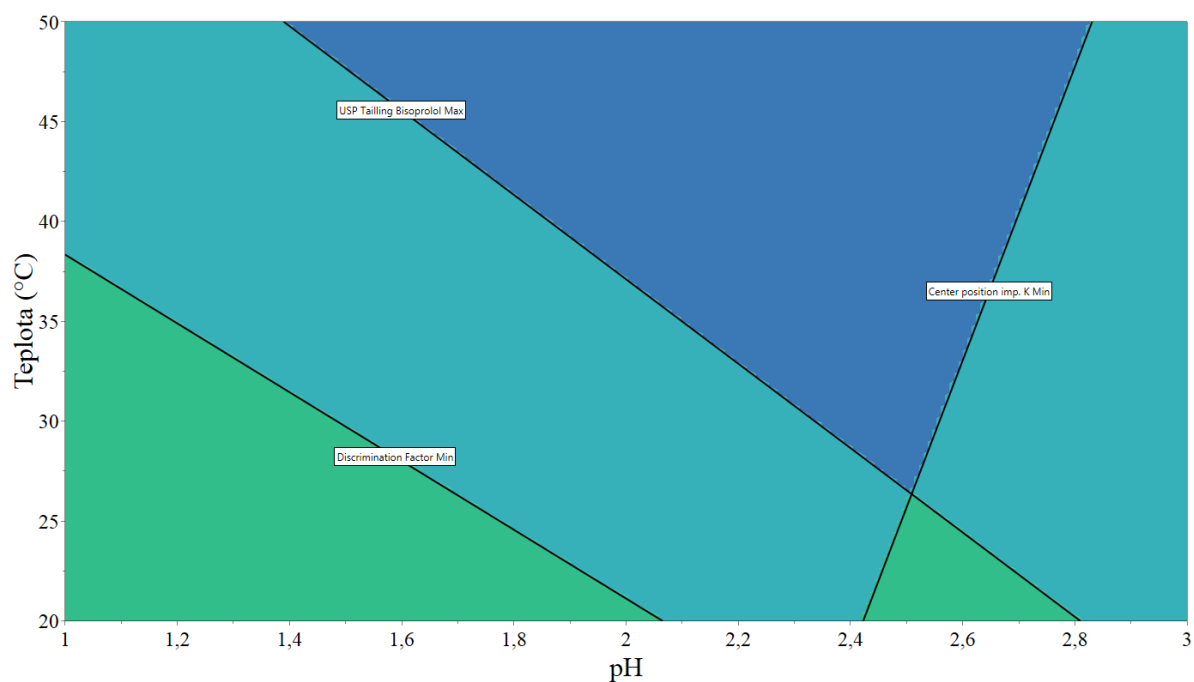
V dalším kroku byl experimentální prostor vizualizován pomocí nástroje sweet spot plot. Experimentální prostor byl vizualizován za konstantní organické složky mobilní fáze, a

to acetonitrilu. Dalším konstantním parametrem byl typ stacionární fáze. Dále byly zvoleny limity vybraných závisle proměnných. Závisle proměnné a jejich limity jsou uvedeny v **Tab. 15**.

Tab. 15 Závisle proměnné a jejich limity zvolené pro nástroj sweet spot plot.

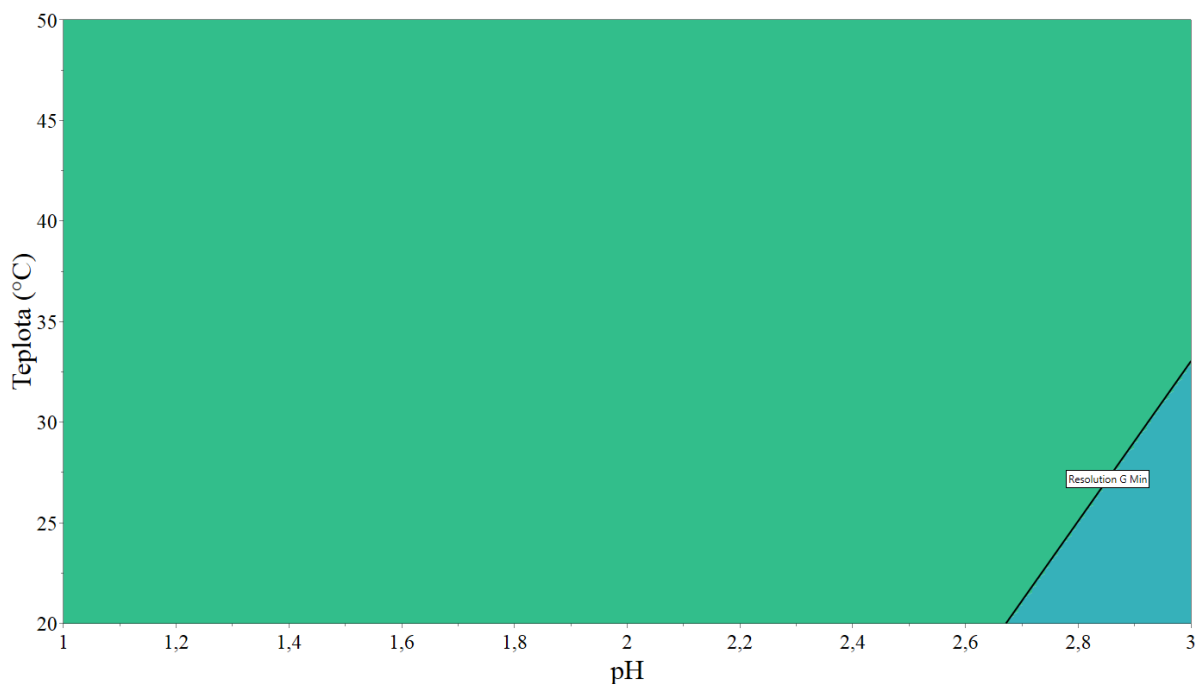
Závisle proměnná	Minimum	Cíl
USP tailing bisoprololu	1	2
Diskriminační faktor bisoprololu-nečistoty G	0,9	1
Rozlišení bisoprololu- nečistoty G	2	-
Rozlišení nečistot imp.1-K	2	-
Centrální pozice nečistoty K	0,065	-
Separční oblast	0,16	-

Jako první byl vizualizován experimentální prostor za konstantní stacionární fáze C18 jakožto stacionární fáze původní metody a acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze, **Obr. 24**. Z grafu je vidět, že v části experimentálního prostoru pH 1-2 a teploty 20-35 °C dochází ke splnění 4 z 6 parametrů. V dalších částech experimentálního prostoru jsou splněny maximálně 3 z 6 parametrů.



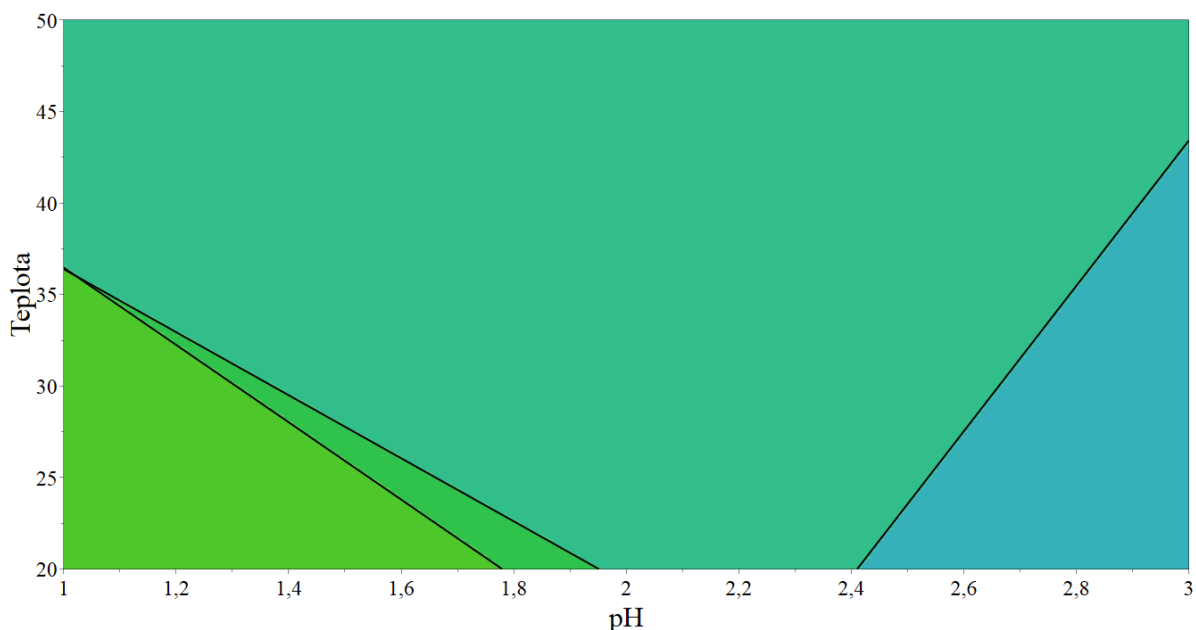
Obr. 24 Sweet spot plot znázorňující experimentální prostor za konstantní stacionární fáze (C18) a organické složky mobilní fáze (acetonitril). Tmavě zelená barva značí prostor, ve kterém došlo ke splnění 4 z 6 parametrů. Tyrkysová barva značí prostor, ve kterém došlo ke splnění 3 z 6 parametrů a v prostoru označeném tmavě modrou barvou došlo ke splnění pouze 2 z 6 parametrů.

V druhé vizualizaci byly za konstantní faktory zvoleny stacionární fáze F5 a acetonitril jako organická složka mobilní fáze **Obr. 25**. Z grafu lze vyčíst, že téměř v celém experimentálním prostoru dochází ke splnění 4 ze 6 parametrů.



Obr. 25 Sweet spot plot znázorňující experimentální prostor za konstantní stacionární fáze (F5) a organické složky mobilní fáze (acetonitril). Tmavě zelená barva značí prostor, ve kterém došlo ke splnění 4 z 6 parametrů. Tyrkysová značí prostor, ve kterém došlo ke splnění 3 z 6 parametrů.

Ve třetí vizualizaci byly za konstantní faktory zvoleny stacionární fáze Phenyl-hexyl a acetonitril jako organická složka mobilní fáze, **Obr. 26**. Na grafu je vidět oblast takzvaného „sweet spotu“ tedy optimálního prostoru a to v rozmezí pH 1,0-1,5 a teploty 20 °C až 35 °C, který je vyznačen světle zelenou barvou. V tomto prostoru jsou splněny všechny zvolené parametry, a proto jsou v tomto prostoru optimální podmínky pro HPLC stanovení čistoty bisoprololu.



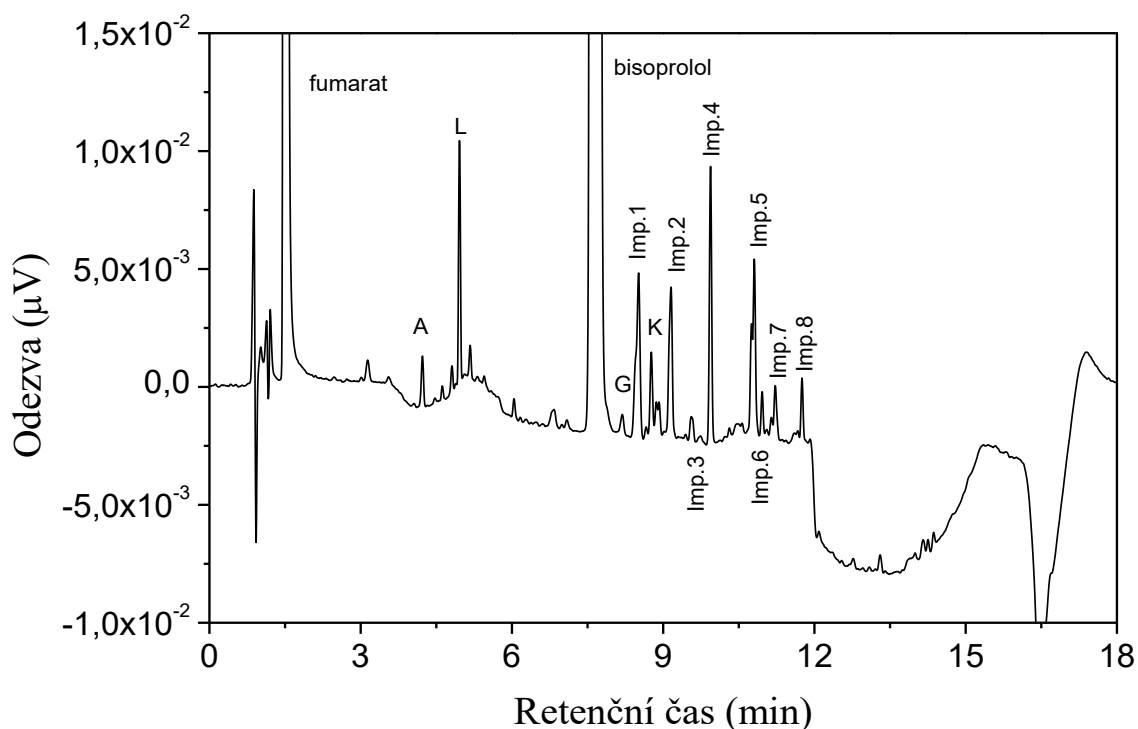
Obr. 26 Sweet spot plot znázorňující experimentální prostor za konstantní stacionární fáze (Phenyl-hexyl) a organické složky mobilní fáze (acetonitril). Svítivě zelená barva značí prostor, ve kterém došlo ke splnění všech parametrů. Tmavší odstín zelené značí prostor, ve kterém došlo ke splnění 5 z 6 parametrů. Tmavě zelená barva značí prostor, ve kterém došlo ke splnění 4 z 6 parametrů. Tyrkysová barva prostor, ve kterém došlo ke splnění 3 z 6 parametrů a v prostoru označeném tmavě modrou barvou došlo ke splnění pouze 2 z 6 parametrů.

V poslední části vyhodnocení pomocí statistického přístupu DoE byl použit nástroj optimalizér. Pomocí optimalizéru byly na základě zadaných závisle proměnných a jejich limitů **Tab. 16** matematicky vypočítány nejvhodnější podmínky HPLC stanovení čistoty bisoprololu.

Tab. 16 Závisle proměnné a jejich limity zvolené pro nástroj optimalizér.

Závisle proměnná	Minimum	Cíl	Maximum
USP tailing bisoprololu	-	1	2
Diskriminační faktor bisoprololu-nečistoty G	0,9	1	-
Rozlišení bisoprolol- nečistoty G	2	3	-
Rozlišení nečistot imp.1-K	2	3	-
Centrální pozice nečistoty K	0,065	0,13	-
Separační oblast	0	1	-

Jako nejvhodnější podmínky pro HPLC stanovení čistoty bisoprololu byly vypočítány acetonitril jako organická složka mobilní fáze, Phenyl-hexyl jako stacionární fáze, teplota 20 °C a pH 1,0. Na **Obr. 27** je zobrazen chromatogram HPLC stanovení čistoty bisoprololu za vypočtených optimálních podmínek.



Obr. 27 Chromatogram stanovení čistoty bisoprololu za vypočtených podmínek pomocí nástroje optimalizér. (Kolona: Kinetex Phenyl-hexyl 100 × 4,6 mm; 2,6 µm)

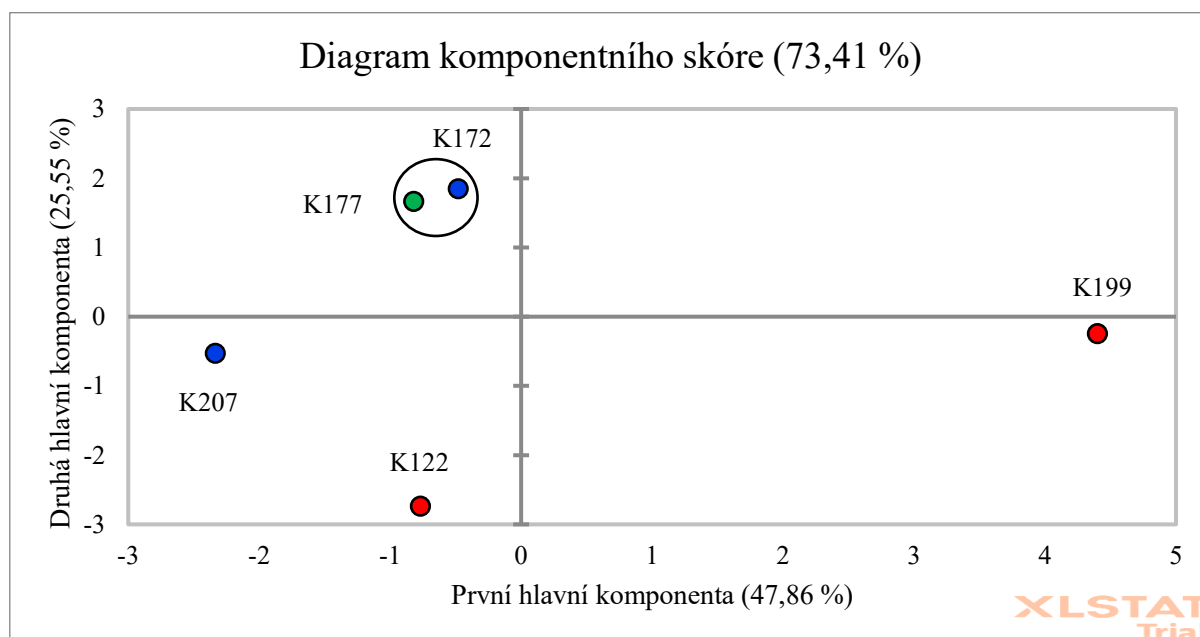
5.3.7 Vyhodnocení screeningu kolon

Do screeningu kolon HPLC stanovení čistoty bisoprololu byly zahrnuty kolony se stacionárními fázemi Phenyl-hexyl a Biphenyl. Přehled kolon a jejich vlastností je uveden v **Tab. 17**. Všechna měření prováděná při screeningu byla prováděna za chromatografických podmínek vypočítaných za pomoci nástroje optimalizér.

Tab. 17 Přehled kolon použitých pro screening kolon pro stanovení čistoty bisoprololu.

Kód kolony	Název kolony	Velikost částic (μm)	Typ sorbentu	Povrch	Technologie částic
K199	Xselect CSH Phenyl Hexyl	2,5	Hybridní	Kladně nabitý	Plně porézní
K172	Ascentis Express Phenyl-Hexyl	2,7	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K122	PoroShell 12 Phenyl-Hexyl	2,7	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K177	Kinetex Phenyl-Hexyl	2,6	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K207	Kinetex Biphenyl	2,6	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro

Po provedení stanovení na všech testovaných kolonách byly u všech chromatogramů vyhodnoceny tyto chromatografické parametry: USP tailing bisoprololu, diskriminační faktor bisoprololu-nečistoty G, separační oblast, centrální pozice nečistoty K a rozlišení jednotlivých píků. Data získaná z chromatogramů byla statisticky zpracována za pomoci analýzy hlavních komponent, která byla vizualizována diagramem komponentního skóre, **Obr. 28**.



Obr. 28 Diagram komponentního skóre screeningu kolon pro stanovení čistoty bisoprololu.

Na diagramu komponentního skóre můžeme pozorovat shluk dvou bodů K177, který značí původní kolonu použitou při vývoji HPLC metody pomocí přístupu DoE, a K172. Tyto dvě kolony splňují všechny parametry vložené do nástroje optimalizér a mají statisticky podobné hodnoty chromatografických parametrů, a proto jsou vhodné pro stanovení čistoty

bisoprololu. Podobnost hodnot chromatografických parametrů, může být způsobena podobnými vlastnostmi kolon. Obě jsou to takzvané core-shell kolony a mají nenabíý povrch. Oproti tomu kolona K199, která je plně porézní a má kladně nabíý povrch, nesplnila parametry vložené do nástroje optimalizér. Na koloně K122 nebyla separována nečistota G od bisoprololu, a proto je pro stanovení čistoty bisoprololu nevhodná.

5.3.8 Diskuze bisoprolol

Jedním z dílčích cíů bylo převést metodu na kratší kolonu s menší velikostí částic. Dále byla provedena změna mobilní fáze, místo roztoku kyseliny fosforečné byl zvolen 10 mmol pufr dihydrogenfosforečnanu amonného. Hlavním cíem bylo prozkoumat experimentální prostor za účelem jeho zmapování a nalezení vhodnějších podmínek separace. Experimentální prostor byl zmapován a bylo v něm nalezeno optimum při použití stacionární fáze Phenyl-hexyl, acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze, teploty kolony 20 °C a pH pufru 1,0. Převodem a nalezením vhodnějších podmínek separace byla celková doba analýzy zkrácena o více než polovinu a rozlišení nečistot ve sledovaném klastru za píkem bisoprololu se zlepšilo, což můžeme pozorovat porovnáme-li **Obr. 20**, na kterém je chromatogram převedené metody na stanovení čistoty bisoprololu a **Obr. 27**, na kterém je zobrazen chromatogram optimalizované metody. Při screeningu kolon a následném vyhodnocení pomocí analýzy hlavních komponent bylo zjištěno, že pro stanovení čistoty bisoprololu je možno použít kolony Kinetex Phenyl-Hexyl o rozměrech 100 × 4,6 mm a velikosti částic 2,6 μm a Ascentis Express Phenyl-Hexyl 100 × 4,6 mm a velikosti částic 2,7 μm.

5.4 Risperidon

5.4.1 Cíle

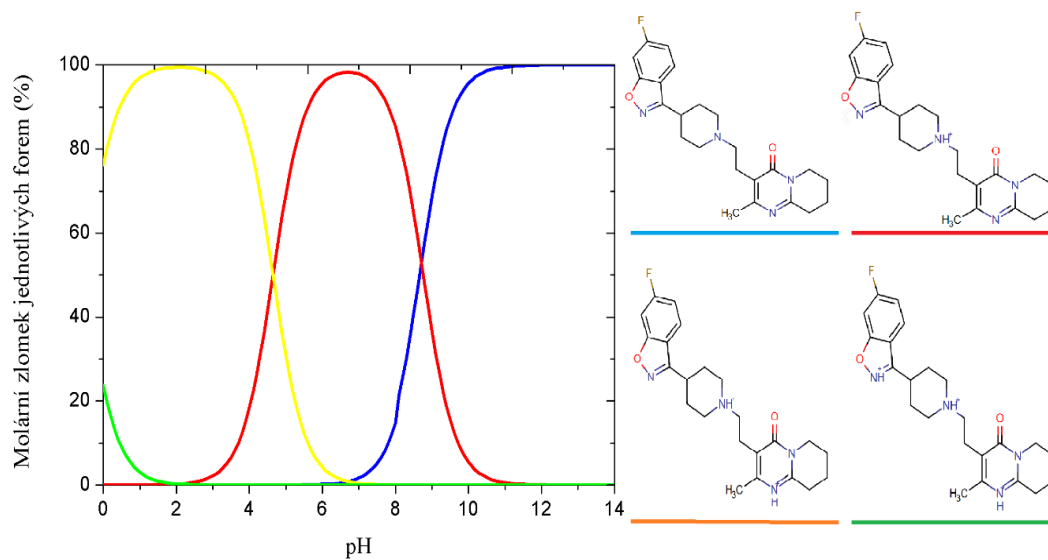
Cílem bylo ověřit funkčnost vyvinutého systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE. Druhým cílem bylo prozkoumat experimentální prostor v okolí metody na stanovení čistoty risperidonu a nalézt vhodnější podmínky pro separaci risperidonu a jeho nečistot. Dalším dílčím cílem bylo upravit vodnou složku mobilní fáze tak, aby měla vyšší pufrací kapacitu.

5.4.2 Volba nezávisle proměnných

Po nashromáždění dostatku informací o risperidonu a o jeho metodě na stanovení čistoty jsem zvolil nezávisle proměnné. Jako kvantitativní nezávisle proměnné byla zvolena teplota na koloně v rozmezí 25-50 °C tak, aby se pokrylo co největší teplotní rozmezí. V lékopisné metodě byl jako vodná složka mobilní fáze použit roztok octanu amonného o koncentraci 5 g/l, Tato vodná složka MF byla nahrazena 10 mM roztokem octanu amonného o pH 5,8, což je pH na hraně pufracího rozsahu tohoto pufru a jehož hodnota je nejbližší hodnotě pH roztoku octanu amonného o koncentraci 5 g/l. a proto byla hodnota pH zvolena v rozmezí 3,8-5,8, což je pH rozmezí požitého pufru. Dále bylo rozhodnuto na základě distribučního diagramu⁵⁴, **Obr. 29**, kde se neionizovaná forma risperidonu nachází v rozmezí pH 11-14, což je pH na které nejsou kolony dimenzovány a proto nemohla být tato neionizovaná forma risperidonu použita pro separaci. Kvalitativními nezávisle proměnnými byly zvoleny typy stacionární fáze, a to C18, Phenyl-hexyl a F5. Druhou kvalitativní nezávisle proměnnou byl druh organické složky mobilní fáze v tomto případě acetonitril/methanol. Přehled nezávisle proměnných je uveden v **Tab. 18**.

Tab. 18 Přehled zvolených nezávisle proměnných.

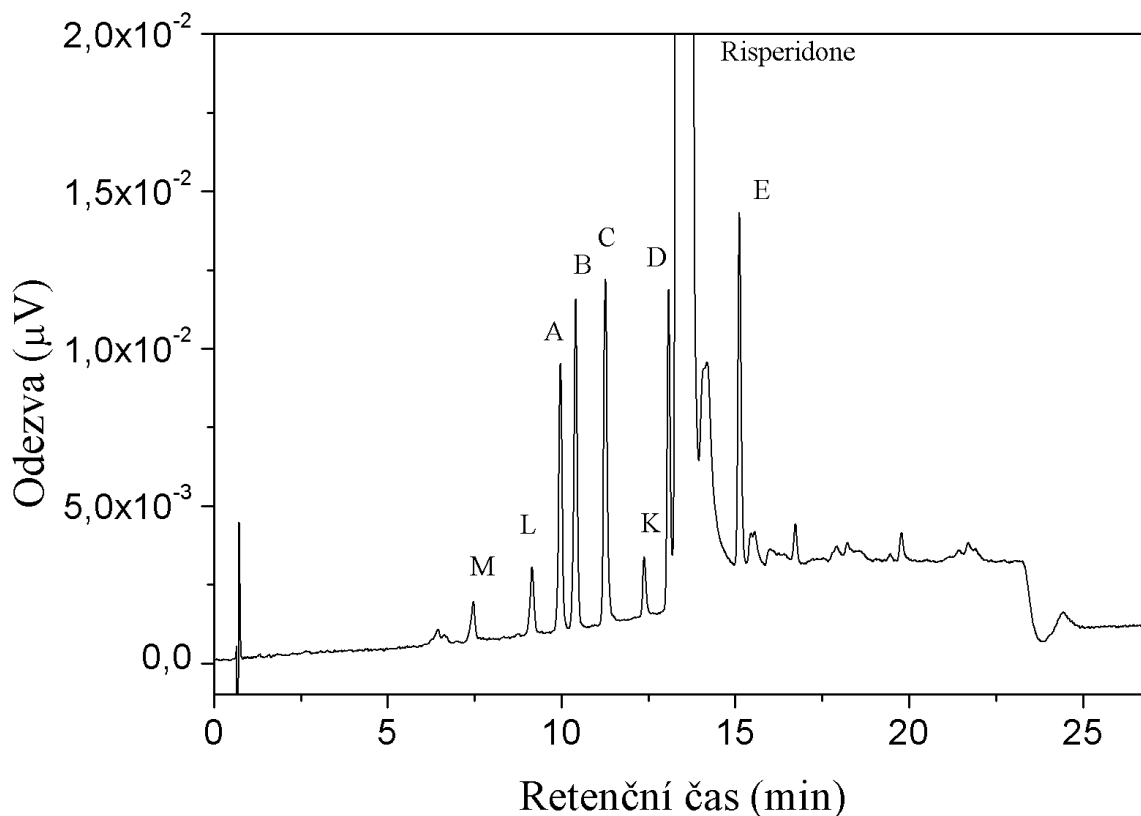
Název nezávisle proměnné	Hodnota faktoru
pH	3,8;4,8;5,8
Stacionární fáze	C8, F5, Phenyl-hexyl
Teplota (°C)	25; 35; 50
Organická složka MF	acetonitril, methanol



Obr. 29 Distribuční diagram risperidonu. (převzato⁵⁴)

5.4.3 Volba závisle proměnných

Ze získaných dat z chromatogramu stanovení čistoty risperidonu lékopisnou metodou **Obr. 30**, byly za závisle proměnné vybrány tyto chromatografické parametry, separační oblast, rozlišení jednotlivých píků a symetrie hlavního píku risperidonu jako USP tailing.



Obr. 30 Chromatogram lékopisné metody na stanovení čistoty risperidonu.(Kolona Kinetex C18 $100 \times 4,6$)

5.4.4 Plán experimentů

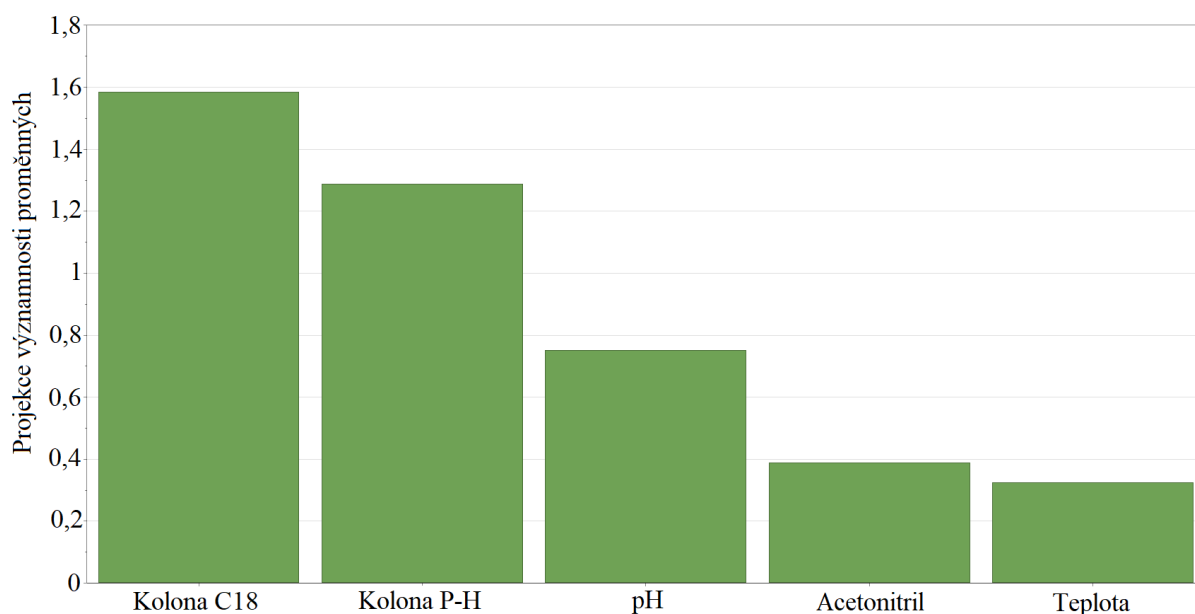
Dle vytvořeného systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE byl pro vytvoření plánu experimentů použit Taguchiho model L18 v softwaru Modde 12. Plán experimentů obsahoval 21 experimentů. Experimenty N19-21 jsou centrální body, tedy výchozí body experimentálního prostoru. Centrálními body byly chromatografické podmínky lékopisné metody. Při všech experimentech byl použit standard risperidonu a jeho nečistot připravený dle lékopisného návodu^{29,55}. Přehled naplánovaných experimentů je uveden v **Tab. 19**.

Tab. 19 Vygenerovaný pracovní list pro prozkoumání experimentálního prostoru v okolí metody na stanovení čistoty risperidonu.

Označení experimentu	pH	Teplota (°C)	Organická složka MF	Kolona
N1	3,8	25	MeOH	F5
N2	3,8	35	MeOH	Phenyl-Hexyl
N3	3,8	50	MeOH	C18
N4	4,8	25	MeOH	F5
N5	4,8	35	MeOH	Phenyl-Hexyl
N6	4,8	50	MeOH	C18
N7	5,8	25	MeOH	Phenyl-Hexyl
N8	5,8	35	MeOH	C18
N9	5,8	50	MeOH	F5
N10	3,8	25	AcN	C18
N11	3,8	35	AcN	F5
N12	3,8	50	AcN	Phenyl-Hexyl
N13	4,8	25	AcN	Phenyl-Hexyl
N14	4,8	35	AcN	C18
N15	4,8	50	AcN	F5
N16	5,8	25	AcN	C18
N17	5,8	35	AcN	F5
N18	5,8	50	AcN	Phenyl-Hexyl
N19	5,8	25	MeOH	C18
N20	5,8	25	MeOH	C18
N21	5,8	25	MeOH	C18

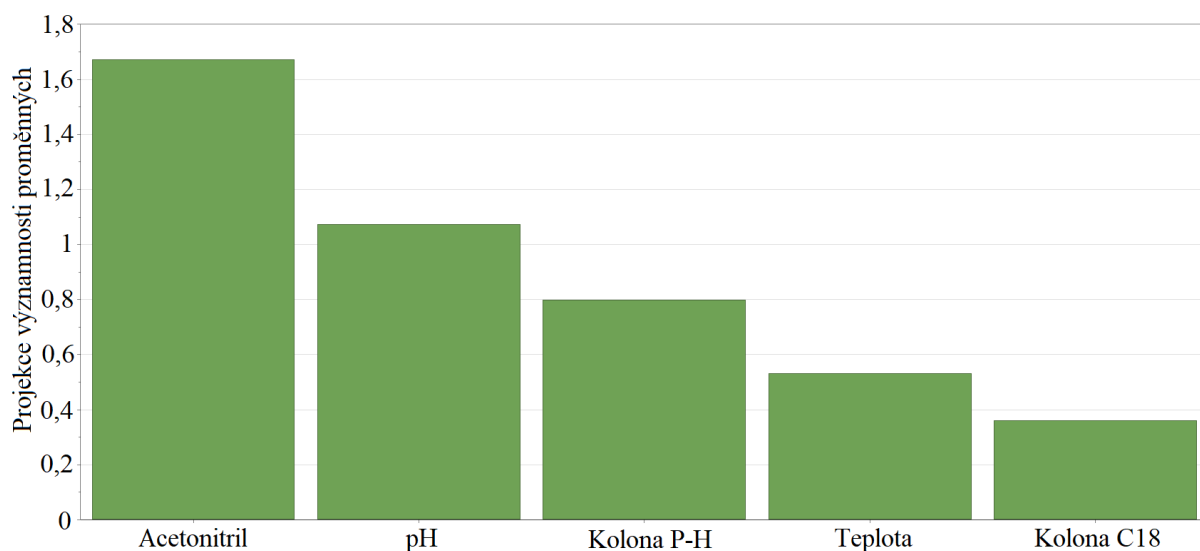
5.4.5 Vyhodnocení design of experiments

Po provedení všech 21 experimentů naplánovaných byla získaná data chromatografických parametrů v software Modde 12 statisticky zpracována metodou částečných nejmenších čtverců. Chování risperidonu na kolonách F5 a Phenyl-hexyl, na kterých byl pík risperidonu velmi rozmytý, mělo za následek koeluci píků nečistot s píkem risperidonu. Tento fenomén ovlivnil vstupní data a tím pádem i matematický model. To mělo například za následek neschopnost software Modde 12 zobrazit data projekcí významnosti proměnných pro celý model, ale jen pro závisle proměnné, pro které měl dostatek dat. Příkladem projekce významnosti proměnných, pro které měl software dostatek dat byla závisle proměnná USP tailing, **Obr. 31**. Z grafu je možné vyčíst, že nezávisle proměnné stacionární fáze C18 a Phenyl-hexyl mají na USP tailing risperidonu statisticky největší vliv. Zbylé nezávisle proměnné nemají na USP tailing risperidonu statisticky významný vliv.



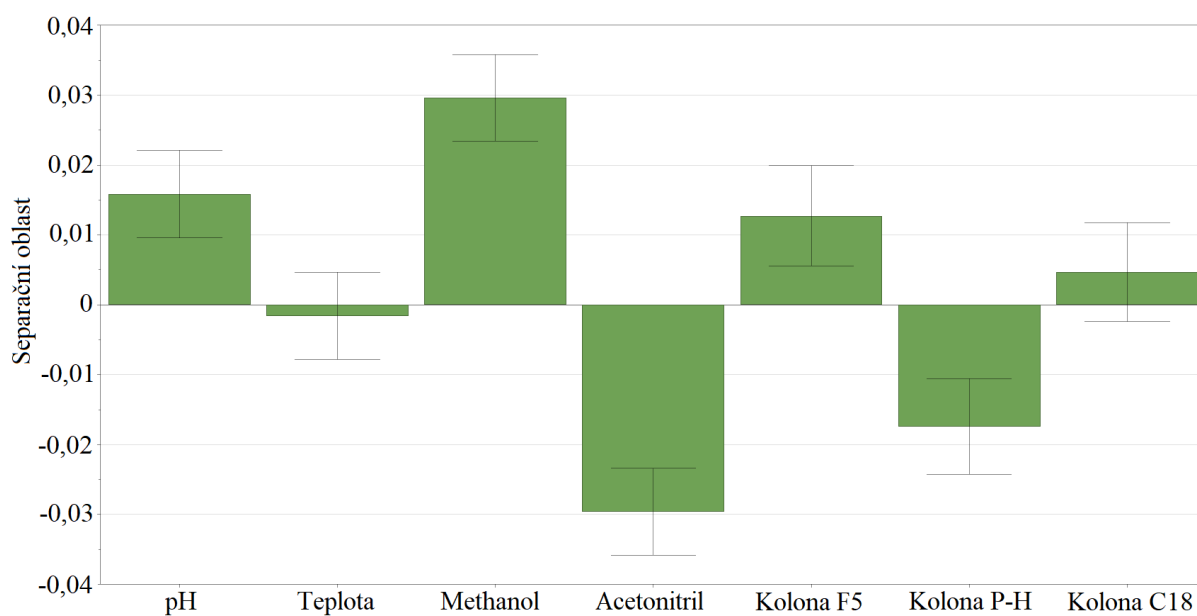
Obr. 31 Projekce významnosti proměnných na závisle proměnnou USP tailing risperidonu.

Pro závisle proměnnou separační oblast byl také sestrojen graf projekce významnosti proměnných, **Obr. 32**. Z grafu je patrné, že největší vliv má na separační oblast nezávisle proměnná organická složka mobilní fáze acetonitril. Druhou významnou nezávisle proměnnou s vlivem na separační oblast je pH. Méně významnou nezávisle proměnnou je stacionární fáze Phenyl-hexyl. Ostatní nezávisle proměnné nemají na separační oblast statisticky významný vliv.



Obr. 32 Projekce významnosti proměnných na závisle proměnnou separační oblast stanovení čistoty risperidonu.

Na **Obr. 33** je zobrazen graf koeficientů pro separační oblast, ze kterého je patrné, že na separační oblast má acetonitril jako organická složka mobilní fáze negativní vliv. Oproti tomu methanol má na separační oblast pozitivní vliv.



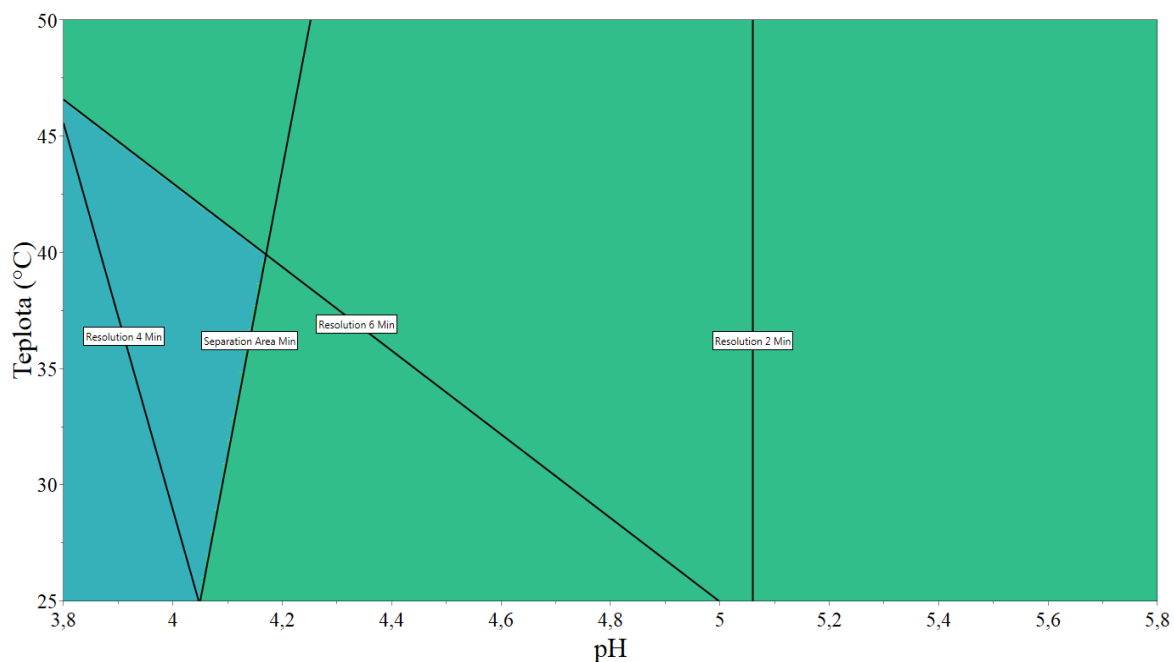
Obr. 33 Graf koeficientů pro separační oblast stanovení čistoty risperidonu.

V dalším kroku vyhodnocení byly promítnuty experimentální prostory za konstantních nezávisle proměnných methanolu coby organické složky mobilní fáze a stacionárních fází pomocí nástroje sweet spot. Hodnoty závisle proměnných a jejich limitů vložených do nástroje sweet spot jsou uvedeny v **Tab. 20**.

Tab. 20 Závisle proměnné a jejich limity zvolené pro nástroj sweet spot plot.

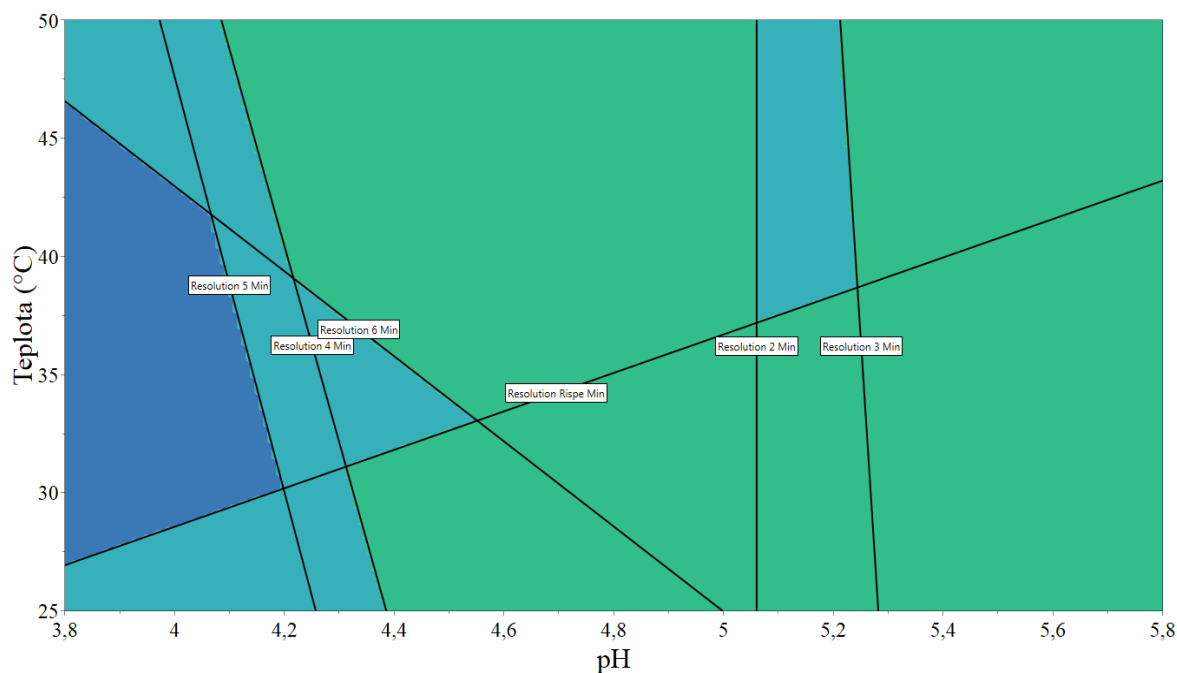
Závisle proměnná	Minimum	Cíl
USP tailing risperidonu	1	1,5
Rozlišení nečistoty M	2	-
Rozlišení nečistoty L od nečistoty M	2	-
Rozlišení nečistoty A od nečistoty L	2	-
Rozlišení nečistoty B od nečistoty A	2	-
Rozlišení nečistoty C od nečistoty B	2	-
Rozlišení nečistoty K od nečistoty C	2	-
Rozlišení nečistoty D od nečistoty K	2	-
Rozlišení nečistoty D od risperidonu	2	-
Rozlišení risperidonu od nečistoty E	2	-
Separáční oblast	0,18	-

Jako první byl vizualizován experimentální prostor pro stacionární fázi F5 a methanol jako organickou složku mobilní fáze, **Obr. 34**. Z grafu je vidět, že téměř v celém experimentálním prostoru dochází ke splnění 6-7 podmínek z 11 a v malé části experimentálního prostoru v rozmezí pH 3,8-4,0 a teplotním rozmezí 25-45 °C dochází ke splnění pouze 4-5 podmínek z 11. Na základě informací z nástroje sweet spot je zřejmé, že stacionární fáze F5 není vhodná pro stanovení čistoty risperidonu.



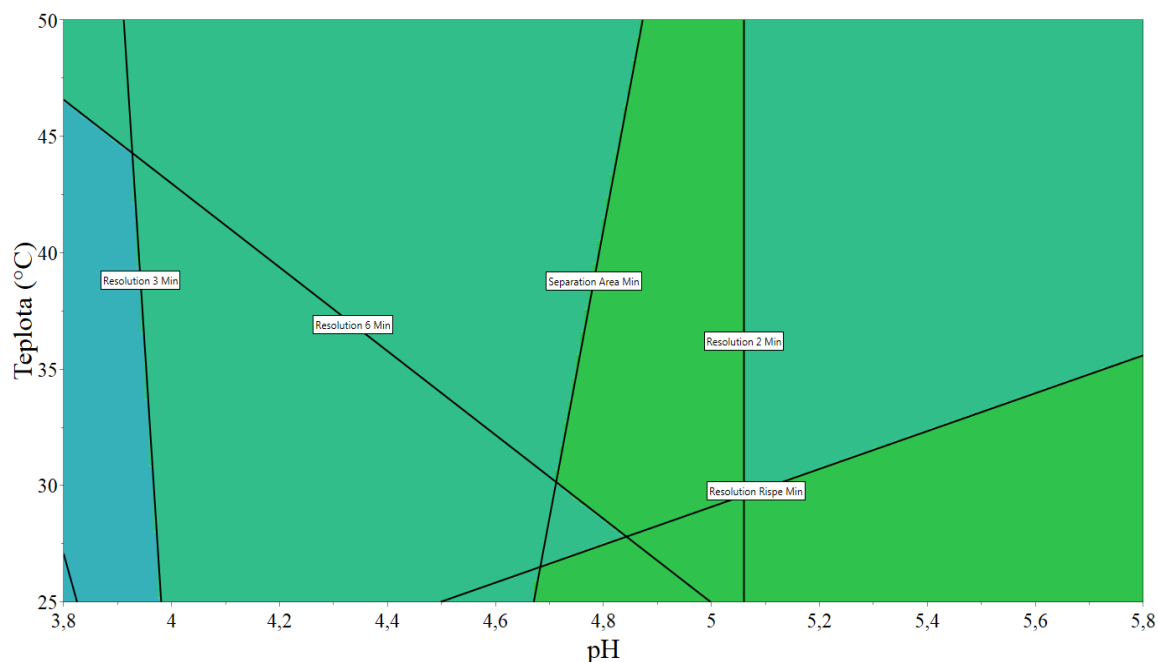
Obr. 34 Sweet spot plot znázorňující experimentální prostor za konstantní stacionární fáze (F5) a organické složky mobilní fáze (methanol). Tmavě zelená barva značí prostor, ve kterém dochází ke splnění 6-7 parametrů z 11. V tyrkysově zbarvené části prostoru dochází ke splnění 4-5 parametrů z 11.

V druhé vizualizaci byl zobrazen experimentální prostor pro stacionární fázi Phenyl-hexyl a methanol jako organickou složku mobilní fáze, **Obr. 35**. Z grafu je vidět, že stacionární fáze Phenyl-hexyl také není vhodná k stanovení čistoty risperidonu, jelikož v celém experimentálním prostoru dochází ke splnění maximálně 6-7 podmínek z 11.



Obr. 35 Sweet spot plot znázorňující experimentální prostor za konstantní stacionární fáze (Phenyl-hexyl) a organické složky mobilní fáze (methanol). Tmavě zelená barva značí prostor, ve kterém dochází ke splnění 6-7 parametrů z 11. V tyrkysově zbarvené části prostoru dochází ke splnění 4-5 parametrů z 11. Tmavě modrá barva značí prostor, ve kterém dochází ke splnění 2-3 parametrů z 11.

V poslední vizualizaci byl zobrazen experimentální prostor pro stacionární fázi C8 a methanol jako organickou složku mobilní fáze, **Obr. 36**. V grafu je možné najít oblasti, kde je splněno 9-10 z 11 podmínek. Jedna z těchto oblastí se nachází v rozmezí pH 4,8-5,1 a teplotním rozmezí od 25-50 °C. Druhá oblast se nachází v rozmezí pH 4,8-5,8 a teplotním rozmezí 25-35 °C. Ve zbytku experimentálního prostoru dochází maximálně ke splnění 7-8 z 11 podmínek. Na základě informací z nástroje sweet spot byla jako vhodná stacionární fáze pro stanovení čistoty risperidonu vyhodnocena C8.



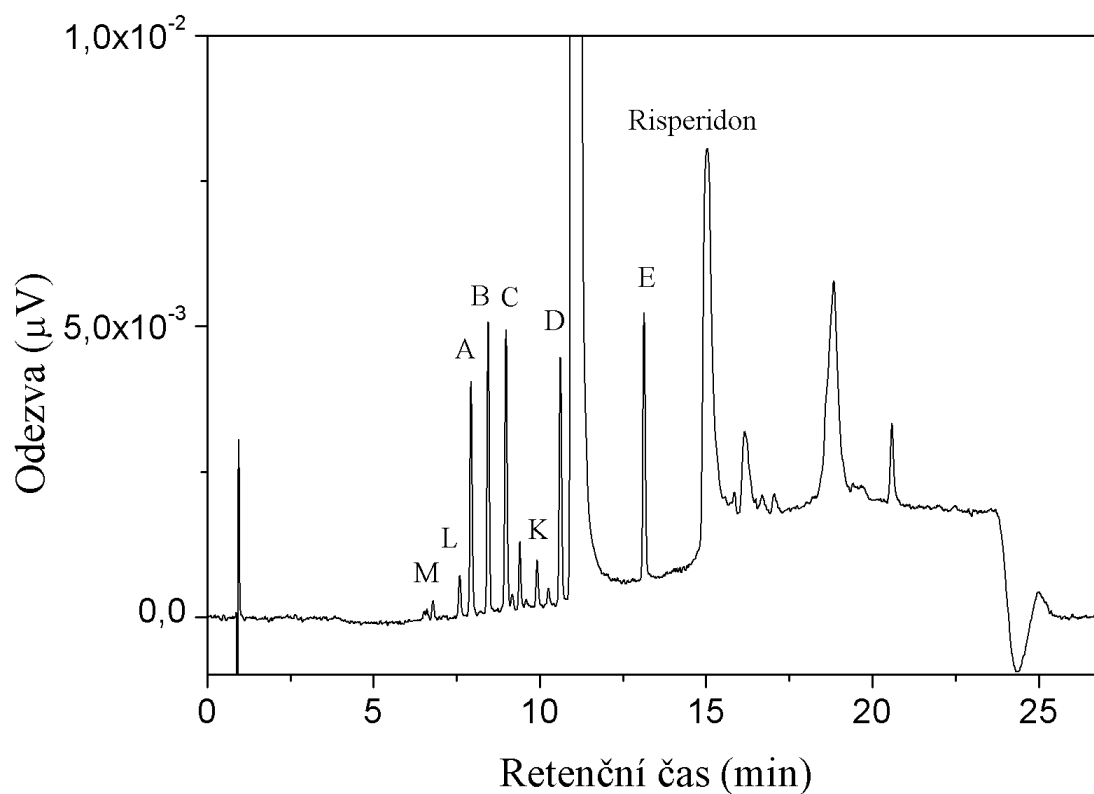
Obr. 36 Sweet spot plot znázorňující experimentální prostor za konstantní stacionární fáze (C8) a organické složky mobilní fáze (methanol). Zelená barva značí prostor, ve kterém dochází ke splnění 9-10 parametrů z 11. Tmavě zelená barva značí prostor, ve kterém dochází ke splnění 7-8 parametrů z 11. V tyrkysově zbarvené části prostoru dochází ke splnění 5-6 parametrů z 11.

V závěrečné fázi vyhodnocení DoE byl použit nástroj optimalizér. Jeho pomocí byly vypočítány nejvhodnější podmínky separace pro stanovení čistoty risperidonu na základě zadaných limitů zvolených závisle proměnných. Přehled zvolených závisle proměnných a jejich limitů je uveden v **Tab. 21**.

Tab. 21 Závisle proměnné a jejich limity zvolené pro nástroj optimalizér.

Závisle proměnná	Minimum	Cíl	Maximum
USP tailing risperidonu	-	1	1,5
Rozlišení nečistoty M	2	5	-
Rozlišení nečistoty L od nečistoty M	2	5	-
Rozlišení nečistoty A od nečistoty L	2	5	-
Rozlišení nečistoty B od nečistoty A	2	5	-
Rozlišení nečistoty C od nečistoty B	2	5	-
Rozlišení nečistoty K od nečistoty C	2	5	-
Rozlišení nečistoty D od nečistoty K	2	5	-
Rozlišení nečistoty D od risperidonu	2	5	-
Rozlišení risperidonu od nečistoty E	2	5	-
Separční oblast	0,18	1	-

Jako optimální podmínky pro separaci risperidonu a jeho nečistot byly vypočítány, methanol jako organická složka mobilní fáze, kolona C18 jako typ stacionární fáze, pH 5,8 a teplota na koloně 30 °C. Chromatogram stanovení čistoty risperidonu za vypočtených separačních podmínek je zobrazen na **Obr. 37**.



Obr. 37 Chromatogram stanovení čistoty risperidonu za vypočtených podmínek pomocí nástroje optimalizér. (Kolona: Kinetex C18 100 × 4,6 mm; 2,6 µm)

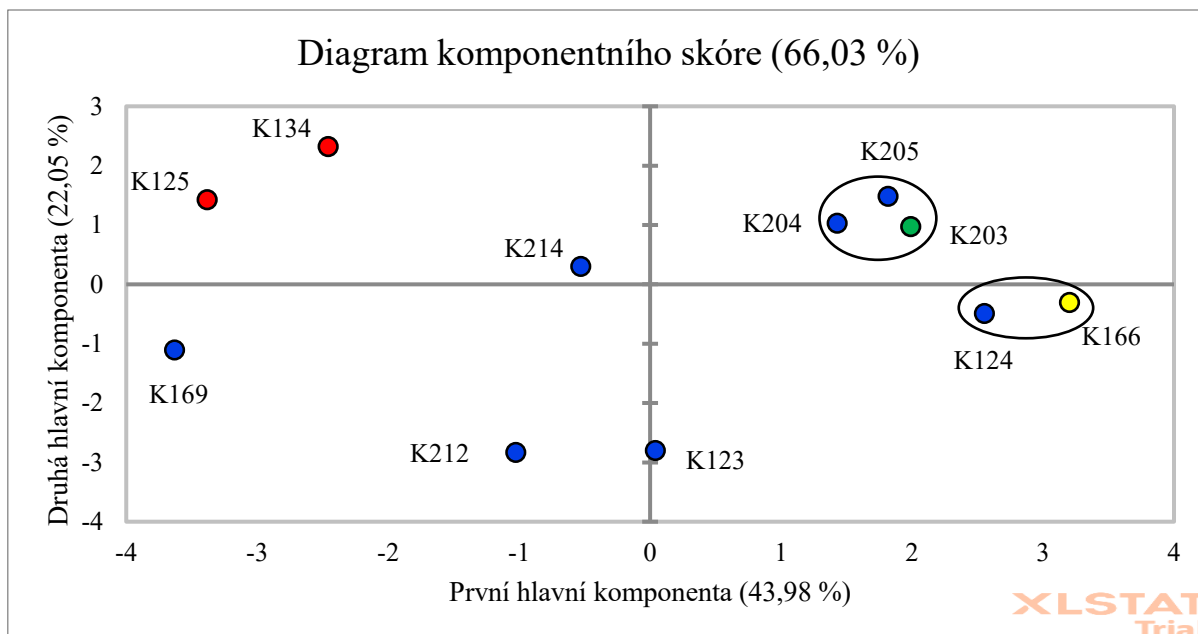
5.4.6 Vyhodnocení screeningu kolon

Pro screening kolon metody na stanovení čistoty risperidonu byly zahrnuty stacionární fáze C18 a C8. Přehled použitých kolon a jejich vlastností je uveden v **Tab. 22**. Všechna stanovení byla prováděna za separačních podmínek vypočtených nástrojem optimalizér.

Tab. 22 Přehled kolon použitých pro screening kolon pro stanovení čistoty risperidonu.

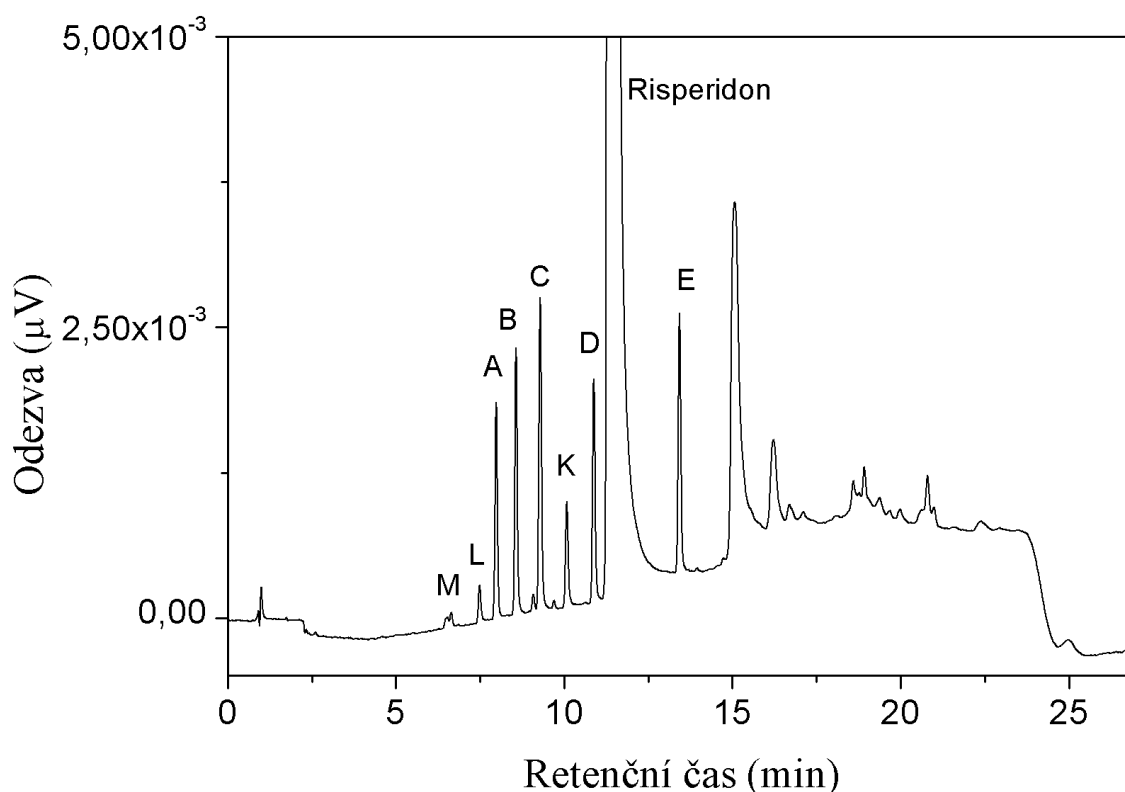
Kód kolony	Název kolony	Velikost částic (μm)	Typ sorbentu	Povrch	Technologie částic
K204	Kinetex Polar C18	2,6	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K205	Luna OMEGA PS C18	3,0	Silikagel	Kladně nabitý	Plně porézní
K169	Kinetex EVO C18	2,6	Hybridní	Nenabitý	Pevné jádro
K125	Poroshell 120 SB C18	2,7	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K166	Ascentis Express C18	2,7	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K124	Poroshell 120 EC C18	2,7	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K134	Cortecs + C18	2,7	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K123	Poroshell 120 EC C8	2,7	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K212	Xbridge BEH C8	2,5	Hybridní	Nenabitý	Plně porézní
K214	Kinetex C8	2,6	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro
K203	Kinetex C18	2,6	Silikagel	Nenabitý	Pevné jádro

Po provedení stanovení čistoty risperidonu na všech testovaných kolonách, bylo z chromatogramů vyhodnoceno rozlišení všech píků, USP tailing píku risperidonu a separační oblast. Získaná data byla podrobena analýze hlavních komponent, která byla vizualizována pomocí diagramu komponentního skóre, **Obr. 37**.



Obr. 37 Diagram komponentního skóre screeningu kolon pro stanovení čistoty risperidonu.

Na diagramu komponentního skóre můžeme pozorovat shluk tří bodů K203, který značí původní kolonu použitou při DoE, K204 a K205. Tyto 3 kolony měly statisticky podobné hodnoty vyhodnocovaných chromatografických parametrů. Kolony K203 a K204 mají stejné vlastnosti. Obě mají částice vyrobené technologií pevného jádra. Kolona K205 má oproti kolonám K203 a K204 jiné vlastnosti, zato má větší velikost částic a její částice nejsou vyrobeny technologií pevného jádra. Statistická podobnost kolony K205 s kolonami K203 a K204 může být způsobena individuálními vlastnostmi kolony a risperidonu. Druhý shluk bodů obsahuje K166, který značí, že tato kolona měla lepší hodnoty sledovaných chromatografických parametrů než původní kolona použitá při DoE a K124. Obě tyto kolony mají stejné vlastnosti. Obsahují částice vyrobené technologií pevného jádra, mají nenabitý povrch a stejnou velikost částic. Ze screeningu kolon vyplývá, že pro stanovení čistoty risperidonu, můžeme použít 5 kolon, aniž by došlo k ovlivnění separačních vlastností metody. Na **Obr. 38** je chromatogram stanovení čistoty risperidonu na koloně K166 Ascentis Express C18 o rozměrech 100 × 4,6 mm a velikosti 2,7 μm, která vyšla ze screeningu kolon jako statisticky nejvhodnější pro toto stanovení.



Obr. 38 Chromatogram stanovení čistoty risperidonu za vypočtených podmínek pomocí nástroje optimalizér. (Kolona Ascentis Express C18 100 × 4,6 mm; 2,7 µm)

5.4.7 Diskuze risperidon

Cílem bylo aplikovat systematický postup pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE. Dalším cílem bylo prozkoumat a zmapovat experimentální prostor v okolí metody na stanovení čistoty risperidonu a nalézt nejvhodnější podmínky pro separaci risperidonu a jeho nečistot. Statistický model byl ovlivněn tím, že stacionární fáze F5 a Phenyl-hexyl se ukázaly jako nevhodné pro separaci risperidonu a jeho nečistot. Tento fakt způsobil, oslabení statistického modelu jako celku. Jako optimální podmínky byly určeny methanol jako organická složka mobilní fáze a stacionární fáze C18, které byly použity i v původní lékopisné metodě. Oproti tomu se změnilo pH mobilní fáze z 6,8 (octanu amonného o koncentraci 5 g/l) na pH 5,8, udržovaného 10 mmol/l roztokem octanu amonného. Teplota na koloně byla oproti lékopisné metodě zvýšena z původních 20 °C na 30 °C. Změna vodné složky mobilní fáze a zvýšení teploty mělo za následek odseparování nečistoty D od píku risperidonu což můžeme pozorovat porovnáním **Obr. 30** na kterém je chromatogram původní lékopisné metody, a **Obr. 38** na kterém je chromatogram optimalizovan metody na stanovení čistoty risperidonu. Ze screenigu kolon vyšla jako

nejvhodnější kolona Ascentis Express C18 o rozměrech $100 \times 4,6$ mm a velikosti částic 2,7 μm . Pro tuto metodu je možné použít další 4 kolony.

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit systematický postup pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE. Tento systém byl vytvořen na základě získávání poznatků a zkušeností při vývoji HPLC metod na stanovení čistoty esomeprazolu, bisoprololu a risperidonu pomocí statistického přístupu DoE.

V první fázi byla vytvořena kostra systému, který byl aplikován na vývoj metody na stanovení čistoty esomeprazolu. Experimentální prostor v okolí metody byl prozkoumán a zmapován. Jako nejvhodnější podmínky pro separaci esomeprazolu a jeho nečistot byly vyhodnoceny: stacionární fáze C8, pH pufru 7,4, teplota na koloně 20 °C a acetonitril jako organická složka mobilní fáze. Ze screeningu kolon bylo zjištěno, že nejlepší kolonou pro separaci esomeprazolu a jeho nečistot je kolona Ascentis Express C18, je však možné použít i původní kolonu Xbridge BEH C8, Kinetex Polar C18, Poroshell 120 EC C8 nebo Kinetex C18, aniž by došlo ke zhoršení separační schopnosti metody.

Na základě systematického postupu pro vývoj HPLC metody pomocí statistického přístupu DoE byl proveden vývoj metody na stanovení čistoty bisoprololu. Byl prozkoumán a zmapován experimentální prostor v okolí metody. Jako nejvhodnější podmínky separace pro stanovení čistoty esomeprazolu byly určeny stacionární fáze Phenyl-hexyl, acetonitril jako organická složka mobilní fáze, teplota kolony 20 °C a pH pufru 1,0. Ze screeningu kolon a následnou analýzou hlavních komponent byla jako nejvhodnější kolona vybrána Kinetex Phenyl-hexyl. Další kolonou, která je pro stanovení čistoty bisoprololu vhodná, je kolona Ascentis Express Phenyl-hexyl.

Vývoj metody na stanovení čistoty risperidonu byl proveden dle vytvořeného systematického postupu pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE. Byl prozkoumán a zmapován experimentální prostor v okolí metody. Jako nejvhodnější podmínky separace risperidonu a jeho nečistot byly vyhodnoceny, methanol jako organická složka mobilní fáze, teplota na koloně 30 °C, stacionární fáze C18 a pH pufru 5,8. Ze screeningu kolon vyšla jako nejvhodnější kolona pro stanovení čistoty risperidonu kolona Ascentis Express C18. Dalšími vhodnými kolonami pro toto stanovení jsou kolona Kinetex C18, která byla použita při vývoji metody, Poroshell 120 EC C18, Kinetex Polar C18 a Luna OMEGA PS C18.

Závěrem je možné konstatovat, že systematický postup vývoje HPLC metod přístupem DoE je použitelný, jelikož všechny metody vyvinuté podle tohoto postupu byly přinejmenším stejně vhodné pro účely stanovení čistoty účinných látek jako metody původní. V případě metody stanovení čistoty bisoprololu byly navíc nalezeny výrazně lepší podmínky separace. Systematický postup pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE, který byl vytvořen na základě práce při vývoji výše zmíněných metod na stanovení čistoty účinných látek je uveden v příloze 1.

Seznam použité literatury

- (1) Sudha, T.: Review of experimental design in analytical chemistry. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* **7**:8, 550-565 (2017).
- (2) Sahu, K. P.; Ramiseti, R. N.; Cecchi, T.; Swain, S.; Patro, S. CH.; Panda, J.: *An overview of experimental designs in HPLC method development and validation*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **147**, 590-611 (2018).
- (3) Eriksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Winkstrom, C.; Wold, S.: *Design of Experiments: Principles and Applications*, 3rd ed. Umetrics Academy (2008).
- (4) Taguchiho lineární plány. [on-line] <https://ncss-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/PASS/Taguchi_Designs.pdf> [cit. 13.05.2019]
- (5) Wahla, Q. A.; Iqbal, S.; Anwar, S.; Firdous, S.; Mueller, A. J.: Optimizing the metribuzin degrading potential of a novel bacterial consortium based on Taguchi design of experiment. *Journal of Hazardous Materials* **366**, 1-9 (2019).
- (6) Miller, J. N.; Miller, J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed. Pearson Education (2005).
- (7) Farrésa, M.; Platikanova, S.; Tsakovskib, S.; Taulera, R.: Comparison of the variable importance in projection (VIP) and of the selectivity ratio (SR) methods for variable selection and interpretation. *Journal of Chemometrics* **29**, 528–536 (2015).
- (8) Terzić, J.; Popović, I.; Stajić, A.; Tumpa, A.; Stojanović, B. J.: Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **125**, 385-393 (2016).
- (9) Meloun, M.; Militký, J.; Hill, M.: *Statistická analýza více rozměrných dat v příkladech*, 1st ed. Academia (2012).
- (10) Utts, J.: *Seeing Through Statistics*, 4th ed. Cengage Learning (2014).
- (11) Nováková, L.; Douša, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*, 1st ed. Europrint (2013).
- (12) Nováková, L.; Douša, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*, 1st ed. Europrint (2013).
- (13) Dolan, J.: *A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection*
- (14) Colin, H.; Guiochon, G.: *Journal of Chromatography* **158**, 183 (1978)
- (15) Corradini, D.; Phillips, T. M.: *Handbook of HPLC*, 2nd ed. Taylor and Francis (2010)

- (16) Arul, J.; Abu, R.: Development and validation of a RP-HPLC method for the determination of gentamicin sulfate and its related substances in a pharmaceutical cream using a short pentafluorophenyl column and a Charged Aerosol Detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**:3, 521-531 (2010).
- (17) Sýkora, D.; Tesařová, E.; Vosmanková, M.: Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy*, **101**, 190-199 (2017).
- (18) Hädener, M.; König, S.; Weinmann W.: Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Science International*, **299**, 142-150 2019.
- (19) Gawad, D. A.; Belal, T. S.: HPLC-DAD stability indicating determination of pentoxifyverine citrate. Application to degradation kinetics and assay of syrup dosage form. *Arabian Journal of Chemistry*, **10**:2 2908-2918 (2017).
- (20) Belal, T. S.; Abdel-Hay, M. H.; Sabry, M. S.; Mahgoub, A. A.: HPLC-DAD stability indicating determination of nizatidine in bulk and capsules dosage form. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, **51**:2 185-191 (2013).
- (21) Kinetex Biphenyl [on-line] Dostupné na URL <<https://www.chromservis.eu/p/kinetex-2-6-m-biphenyl-100a-column-150-x-4-6-mm-ea?lang=CZ>> [cit. 13.05.2019]
- (22) Petruczynik, A.; Wróblewski, K.; Szultka-Młyńska, M.; Buszewski, B.; Karakuła-Juchnowicz, H.; Gajewski, J.; Moryłowska-Topolska, J.; Waksmundzka-Hajnos M.: Determination of some psychotropic drugs in serum and saliva samples by HPLC-DAD and HPLC MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **127**, 68-80 (2016).
- (23) Kongkiatpaiboon, S.; Duangdee, N.; Chewchinda, S.; Poachanukoon, O.; Amnuaypattanapon, K.: Development and validation of stability indicating HPLC method for determination of adrenaline tartrate. *Journal of King Saud University – Science*, **31**:1, 48-51 (2019).
- (24) Olšovská, J.; Jurková, M.: New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials. *Kvasný Průmysl*, **58**, 30-35 (2012).
- (25) *Český lékopis* 97, (1997)
- (26) Fallah, M. Z.El.; Martin, M.: Influence of the Peak Height Distribution on Separation Performances: Discrimination Factor and Effective Peak Capacity. *Chromatographia* **24**:1, 115-122 (1987).
- (27) United States Pharmacopoeial Convention, *United States Pharmacopoeia* 39 - *National Formulary* 34. (2016).

- (28) *Empower System Suitability* - Quick reference guide, 71500031605, Revision A, Waters (2002).
- (29) *Český lékopis 2009*, 1st ed. Grada (2009).
- (30) Scott, L.J.; Dunn, C.J.; Mallarkey, G.: Esomeprazole: a review of its use in the management of acid-related disorders. *Drugs*, **62**:10, 1503-1538 (2002).
- (31) Shin, J. M.; Sachs, G.: Pharmacology of proton pump inhibitors. *Current gastroenterology reports*, **10**:6, 528–534 (2012).
- (32) *Nexium SPC* [on-line] Dostupné z URL
<https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/022101s014021957s017021153s0501bl.pdf> [cit. 13.05.2019]
- (33) Nalwade, S. U.; Reddy, V. R.; Rao, D. D.; Morisetti N. K.: A validated stability indicating ultra performance liquid chromatographic method for determination of impurities in Esomeprazole magnesium gastro resistant tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **57**, 109-114 (2012).
- (34) Reddy, P. S.; Hotha, K. K.; Sait, S.: Complexity in estimation of esomeprazole and its related impurities' stability in various stress conditions in low-dose aspirin and esomeprazole magnesium capsules. *Scientia pharmaceutica*, **81**:2, 475–492 (2013).
- (35) Malisetty, S. K.; Rambabu, CH.: Simultaneous determination of aspirin and esomeprazole magnesium in combined tablets by validated UPLC method. *Pharmaceutical Methods*, **4**:1, 26-29 (2013).
- (36) Lancaster, S. G.; Sorkin, E. M.: A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in hypertension and angina pectoris. *Drugs*, **36**:3, 256-285 (1988).
- (37) Bisoprolol fumarate [on-line] Dostupné z URL
<<https://www.drugs.com/monograph/bisoprolol-fumarate.html>> [cit. 13.05.2019]
- (38) Raju, D. S.; Vidyadhara, S.; Rao, B. V.; Madhavi, D.: A modified liquid chromatographic method development and validation for simultaneous of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in bulk and tablets dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **7**:7, 2996-3001 (2016).
- (39) Mahu, S. C.; Spac, A. F.; Ciobanu, C.; Hancianu, M.; Agoroaei, L.; Batnaru, E.: Quantitative Determination of Bisoprolol Fumarate by HPLC. *Revista de Chimie*, **67**, 414-417 (2016).

- (40) Induri I, M.; Raju, B.; Prasad, P.: Validated and stability indicating liquid chromatography method for quantification of bisoprolol fumarate in tablet dosage form. *International Journal of Pharmacy*, **2**:1, 64-70 (2012).
- (41) Szalka, M.; Rokaszewski, E.; Kaczmarzski, K.: Kinetics of Hydrolysis of Bisoprolol Hemifumarate in Aqueous Acidic Solutions. *International Journal of Chemical Kinetics*, **45**:11 (2013).
- (42) Renuka, P.; Ramakrishna, M.; Mani Babu, D.J.: A new chromatographic method developed stability indicating for the simultaneous estimation of bisoprolol and hydrochlorthiazide in pharmaceutical dosage forms. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5**:8, 1322-1331 (2016).
- (43) *Risperidal SPC* [on-line] Dostupné z URL
<<http://www.sukl.cz/download/spc/SPC21040.pdf>> [cit. 13.05.2019]
- (44) Leucht, S.; Cipriani, A.; Spinelli L.; Mavridis D.; Orey D.; Richter F.; Samara M.; Barbui C.; Engel R. R.; Geddes J. R.; Kissling W.; Stapf M. P.; Lässig B.; Salanti G.; Davis J. M.: Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *The Lancet*, **382**:9896, 951-962 (2013).
- (45) Muralidharan, K.; Ali, M.; Silveira, L. E.; Bond, D. J.; Fountoulakis, K. N.; Lam, R. W.; Yatham, L.N.: Efficacy of second generation antipsychotics in treating acute mixed episodes in bipolar disorder: A meta-analysis of placebo-controlled trials. *Journal of Affective Disorders*, **150**:2, 408-414 (2013).
- (46) Tomar, R. S.; Joseph, T. J.; Murthy, A. S. R.; Yadav, D. V.; Subbaiah, G.; Reddy, K.: Identification and characterization of major degradation products of risperidone in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **36**:1, 231-235 (2004).
- (47) El-Sherif, Z. A.; El-Zeany, B.; El-Houssini, O. M.: High performance liquid chromatographic and thin layer densitometric methods for the determination of risperidone in the presence of its degradation products in bulk powder and in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **36**:5, 975-981 (2005).
- (48) Ashour, S.; Kattan, N.: Sensitive method for the quantitative determination of risperidone in tablet dosage form by high-performance liquid chromatography using chlordiazepoxide as internal standard. *International journal of biomedical science*, **9**:2, 91-97 (2013).

- (49) Orkoula, M. G.; Kontoyannis, C. G.: Non-destructive quantitative analysis of risperidone in film-coated tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **47**:3, 631-635 (2008).
- (50) *European Pharmacopoeia 9.0*, (2017)
- (51) Chemikalize. [on-line] Esomeprazol Dostupné z URL
<<https://chemicalize.com/#/calculation>> [cit. 13.05.2019]
- (52) Aplikace na převod HPLC metod [on-line] Dostupné z URL
<<https://www.thermofisher.com/cz/home.html>> [cit. 13.05.2019]
- (53) Chemikalize. [on-line] Bisoprolol Dostupné z URL
<<https://chemicalize.com/#/calculation>> [cit. 13.05.2019]
- (54) Chemikalize. [on-line] Risperidon Dostupné z URL
<<https://chemicalize.com/#/calculation>> [cit. 13.05.2019]
- (55) *Český lékopis 2017*, 1st ed. Grada (2017).

**Systematický postup pro vývoj HPLC
metod pomocí statistického přístupu
Design of experiments**

1 Fáze příprav	1
1.1 Stanovení cíle	1
1.2 Vlastnosti stanovované látky.....	1
1.3 Chromatografické podmínky.....	3
1.4 Chromatografické parametry.....	4
2 Design of Experiments	9
2.1 Volba nezávisle proměnných	9
2.2 Volba statistického modelu	9
2.3 Pracovní list	9
3 Vyhodnocení Design of Experiments.....	10
3.1 Vyhodnocení závisle proměnných	10
3.2 Metoda částečných nejmenších čtverců	10
3.3 Projekce významnosti proměnných	10
3.4 Graf koeficientů.....	11
3.5 Sweet spot.....	11
3.6 Optimalizér	11
4 Fáze po Desing of Experiments	12
4.1 Zkouška nejvhodnějších podmínek separace	12
4.2 Screening kolon	12
4.3 Analýza hlavních komponent.....	12
Seznam použité literatury	13

1 Fáze příprav

1.1 Stanovení cíle

Ve fázi příprav musíme jako první stanovit cíle práce. Při vývoji HPLC metod pomocí Design of Experiments (DoE) to znamená prozkoumat experimentální prostor v okolí výchozích podmínek a nalézt globální optimum celého experimentálního prostoru.

1.2 Vlastnosti stanovované látky

Druhou nezbytnou částí ve fázi příprav je zjistit dostatek informací o stanovovaném analytu.

- **Struktura**

Informace o struktuře může být nápomocná při výběru stacionárních fází, například obsahuje-li analyt ve své struktuře fluor, může pro něj být vhodná pentafluorofenylová stacionární fáze. Pokud analyt obsahuje aromatické kruhy, musíme uvažovat zahrnutí phenylhexylové nebo biphenylové stacionární fáze.

- **Rozpustnost**

Znalost rozpouštědel, ve kterých je analyt rozpustný, je podstatná pro přípravu vzorku k analýze nebo pro výběr vhodného solventu.

- **Distribuční diagram a pK_a**

Distribuční diagram a znalost pK_a analytu jsou nejdůležitější informace při výběru vhodné vodné složky mobilní fáze a jejího pH. Přehled běžně používaných pufrů a jejich rozmezí je uveden v **Tab. 1**.

Tab. 1 Přehled běžně používaných pufrů v RP-HPLC¹

Pufr	pK_a	rozsah pH
Fosfátový	2,1	1,1-3,1
	7,2	6,2-8,2
	12,3	11,3-13,3
Mravenčanový	3,8	2,8-4,8
Octanový	4,8	3,8-5,8
Citrátový	3,1	2,1-4,1
	4,7	3,7-5,7
	5,4	4,4-6,4
Triethylaminový	11,0	10,0-12,0
Pyrolidinový	11,3	10,3-12,3
Borátový	9,23	8,3-10,3

- **Nebezpečnost**

Jednou z nejdůležitějších informací o analytu je informace o jeho nebezpečnosti. Dokud tyto informace neznáme, chováme se k analytu jako jedu!

- **Stabilita**

Informace o stabilitě analytu, pokud jsou známy, nám slouží například ke správnému skladování analytu, jako je chránění analytu před světlem nebo uchovávání analytu v chladu.

Tyto informace se dají najít v internetových databázích jako například www.chemicalize.com nebo v odborné literatuře, ve specifikaci výrobce nebo v Českém lékopise.

1.3 Chromatografické podmínky

V této fázi přípravy je nutné najít v odborných publikacích, které jsou dostupné na portálech jako www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ nebo www.sciencedirect.com, jaké se používají pro danou látku chromatografické parametry:

- **Stacionární fáze**
- **Teplota na koloně**
- **pH pufru**
- **Organická složka mobilní fáze**

Tyto informace jsou pro některé látky dostupné i v Českém lékopise včetně validované metody, ale vzhledem k technologickému pokroku tyto metody nemusí být aktuální.

Po nashromáždění těchto informací je nutné zamyslet se nad výběrem stacionárních fází vzhledem ke struktuře látky. Obsahuje-li analyt nepolární řetězce, je vhodné zařadit do systému stacionární fázi umožňující disperzní nevazebné interakce, jako např. C8 či C18. Obsahuje-li analyt aromatická jádra, pak je možné při separaci uplatnit π - π interakce a je vhodné do systému zahrnout stacionární fáze obsahující aromatická jádra, tedy např. fáze Phenyl-hexyl, či bifenyl. Obsahuje-li látka polární skupiny, jako např. -OH, -NH₂ či obsahuje halogen, je vhodné zahrnout do systému kolonu umožňující dipólové vazby mezi stacionární fází a analytem, jako např. Pentafluorophenyl. Při výběru pH pufrů je nutné zvolit vhodné meze vzhledem k distribučnímu diagramu a *pK_a* stanovované látky. Pro RP-HPLC je zpravidla vhodné zvolit takové pH pufru, aby analyt nebyl ionizován.

1.4 Chromatografické parametry

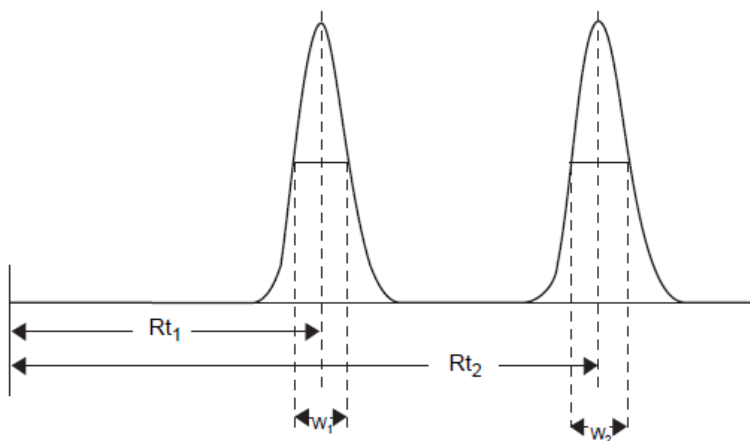
Pro tuto fázi přípravy je nutné provést první měření za výchozích podmínek za účelem určení chromatografických parametrů, které budeme sledovat.

- **Rozlišení**

Rozlišení je nejčastěji používaná veličina v HPLC sloužící k vyjádření míry separace dvou sousedících analytů. Vzorec pro výpočet rozlišení, který pro výpočet používá software Empower 3 je uveden pod odstavcem. Obecně platí, že hodnota rozlišení větší než 1,5 je považována za zcela separované píky.

$$R = \frac{1,18(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2}$$

Rozlišení R se rovná 1,18 násobku rozdílu retenčních časů t_{r2} a t_{r1} podělenému součtem šířky píků w_1 a w_2 v polovině výšky píku². Náskres parametrů použitých k výpočtu rozlišení je uveden na **Obr 1**.

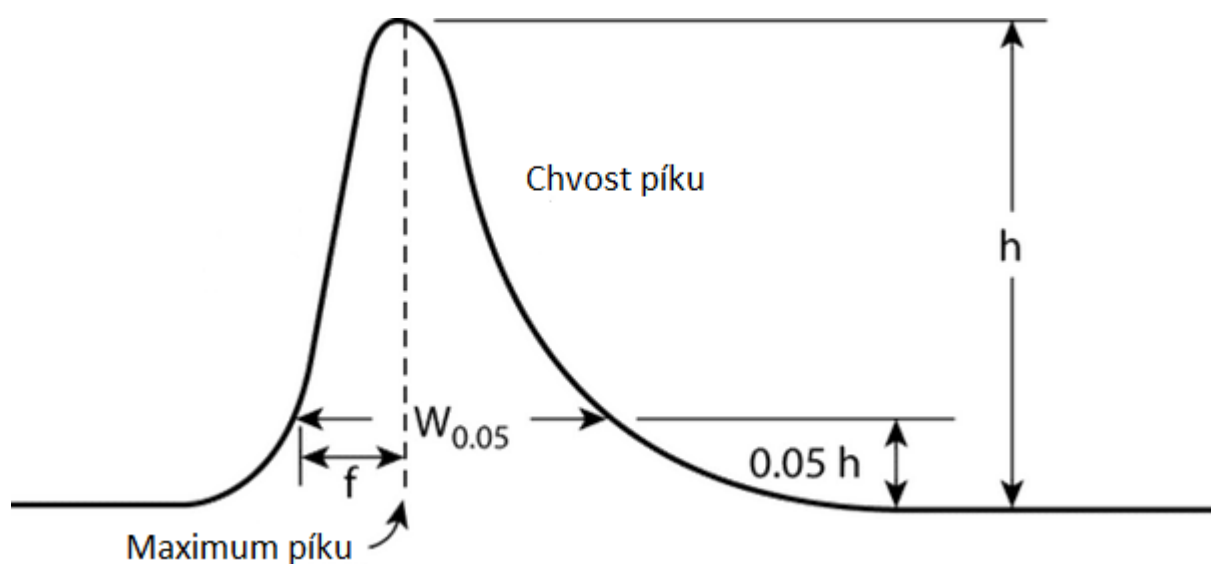


Obr. 1 Náskres parametrů pro výpočet rozlišení (převzato²)

- **Symetrie píku**

K hodnocení symetrie hlavního píku byl vybrán USP tailing. Tento chromatografický parametr slouží k popisu symetrie píku. Vzorec pro výpočet je uveden pod tímto odstavcem. Pokud má USP tailing hodnotu 1, je pík symetrický a nedochází k jeho rozmývání^{3,4}. Schéma popisující parametry pro výpočet USP tailingu je uveden na **Obr. 2**. USP tailing se vypočítá jako podíl šířky píku v jedné dvacetině jeho maximální výšky ($w_{0,05}$) a dvojnásobku vzdálenosti mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho maximální výšky.

$$USP\ tailing = \frac{w_{0,05}}{2 \times f}$$



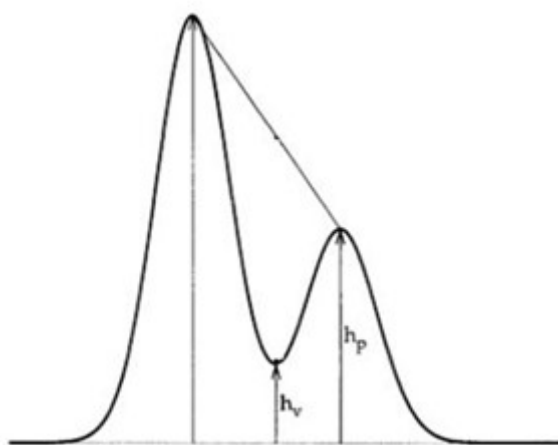
Obr. 2 Nákres parametrů pro výpočet USP tailing (upraveno³)

- **Diskriminační faktor**

Diskriminační faktor (DF), je v některých případech vhodnějším nástrojem pro určení, zda jsou dva píky analytů zcela separovány v případě, kdy se od sebe tyto píky liší řádově výškou. DF se vypočítá podle vztahu:

$$DF = \frac{h_p - h_v}{h_p}$$

DF se rovná rozdílu výšky menšího píku h_p a výšky údolí h_v podělenému výškou menšího píku. Má-li diskriminační faktor hodnotu od 0,9 – 1, je separace příslušných píků považována za dostatečnou⁵. Nákres parametrů používaných pro výpočet DF je uveden na **Obr. 3**.

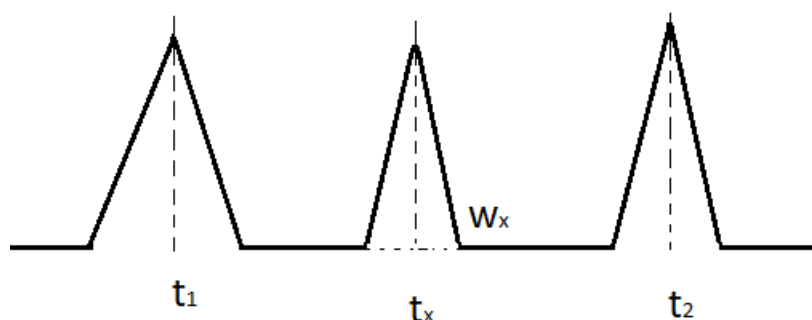


Obr. 3 Nákres parametrů pro výpočet diskriminačního faktoru (převzato⁵).

- **Centrální pozice**

Centrální pozice (Center position) je chromatografický parametr používaný při vývoji metod pomocí statistického přístupu DoE. Tento parametr sleduje pozici prostředního píku mezi dvěma okolními. Vzorec pro výpočet centrální pozice CP je uveden pod tímto odstavcem a schéma parametrů pro jeho výpočet je na **Obr. 4**.

$$CP = \frac{(t_x - t_1) \times (t_2 - t_x)}{(t_2 - t_1)}$$



Obr. 4 Nákres parametrů pro výpočet centrální pozice a limitní hodnoty centrální pozice.

Důležitý parametr pro hodnocení centrální pozice je výpočet limitní hodnoty centrální pozice, který určuje minimální hodnotu centrální pozice, kdy kvalitu separace považujeme za dostatečnou. Vzorec pro výpočet limitní hodnoty centrální pozice CP_{lim} jen uveden pod tímto odstavcem.

$$CP_{limit} = 0,25 \times (3 \times w_x)$$

- **Separační oblast**

Separační oblast (SA) je nástroj sloužící k vyjádření poměrné části z celkové doby analýzy, která slouží k separaci analytů. Zároveň je možno tento parametr použít pro sledování vybrané oblasti chromatogramu a její rozšiřování či zužování, což může popisovat kvalitu separace v dané oblasti. Separační oblast je parametr používaný převážně v přístupu DoE, kde nám slouží ke globálnímu popisu kvality separace v rámci chromatogramu či jeho části. Vzorec pro výpočet SA je následující.

$$SA = \frac{t_{r \text{ posledního píku}} - t_{r \text{ prvního píku}}}{t_{\text{analýzy}}}$$

Separační oblast SA se vypočítá jako rozdíl retenčního času posledního píku sledované oblasti chromatogramu a prvního píku sledované oblasti chromatogramu podělený celkovou dobou analýzy. Separační oblast je bezrozměrná veličina, případně se vyjadřuje v procentech.

Na základě chromatogramu vybereme vhodné chromatografické parametry, které následně budeme vyhodnocovat po provedení vygenerovaných experimentů. Chromatografický parametr, který budeme vyhodnocovat v každém z naplánovaných experimentů je rozlišení jednotlivých píků. Do statistického vyhodnocení pomocí DoE jsou pak zahrnuty pouze kritická rozlišení, která mají nízkou hodnotu v původní metodě či u nich hrozí, že by nízkou hodnotu být mohli. V případě, kdy je jeden pík řádově vyšší než pík sousední, je vhodné pro hodnocení separace těchto píků použít diskriminační faktor. Pro hodnocení a sledování symetrie píku je vhodným nástrojem USP tailling, jehož pomocí lze sledovat vliv nezávisle proměnných na tvar píku. Pokud v chromatogramech vyskytuje pík, který mění svou pozici oproti ostatním píkům je vhodným nástrojem pro sledování tohoto úkazu centrální pozice. Pro sledování zužování a rozšiřování vybrané oblasti chromatogramu je vhodným nástrojem separační oblast.

2 Design of Experiments

2.1 Volba nezávisle proměnných

V tomto kroku vybereme nezávisle proměnné a jejich meze, které budeme zohledňovat při tvorbě pracovního listu.

- **Stacionární fáze**
- **pH pufru**
- **Teplota na koloně**
- **Organická složka mobilní fáze**

2.2 Volba statistického modelu

Prvním úkonem, který je potřeba provést při tvorbě experimentálního plánu, je vybrat vhodný statistický model. Nejpoužívanějšími modely ve fázi screeningu nebo při testování robustnosti jsou Taguchiho lineární modely. Pro vývoj HPLC metod pomocí statistického přístupu DoE je nejvhodnějším Taguchiho lineárním plánem L18. Lineární plán L18 obsahuje jednu nezávisle proměnnou na 2 úrovních a až 7 nezávisle proměnných na 3 úrovních. Vždy obsahuje 18 experimentů a 3 tzv. centrální body, které jsou výchozími body experimentálního prostoru⁶.

2.3 Pracovní list

Při použití Taguchiho lineárního plánu L18 volíme jednu nezávisle proměnnou na dvou úrovních. Touto nezávisle proměnnou je organická složka mobilní fáze acetonitril/methanol. U dalších nezávisle proměnných volíme 3 úrovně. V případě teploty na koloně volíme 3 hodnoty teplot, přičemž vycházíme z teploty původní metody, kterou optimalizujeme. Pokud je to možné, vybereme stejnou teplotu a pak teplotu o 10 °C nižší a o 10 °C vyšší. Pokud je původní teplota nižší než 30 °C, potom volíme teploty o 10 °C a 20 °C vyšší, pokud je teplota vyšší než 50 °C, volíme teploty o 10 °C a 20 °C nižší. Jako stacionární fáze obvykle volíme C8/C18 ; F5 a Phenyl-hexyl. U pH pufru volíme 3 hodnoty uvnitř pufrčního rozsahu zvoleného pufru a zároveň uvnitř intervalu pH, ve kterém molekula analytu není ionizovaná, pokud je to možné. Na základě zvolených nezávisle proměnných a statistického modelu vygenerujeme pracovní list, tedy seznam experimentů, které musíme provést, abychom co nejefektivněji prozkoumali experimentální prostor.

3 Vyhodnocení Design of Experiments

3.1 Vyhodnocení závisle proměnných

Po provedení všech naplánovaných experimentů je dalším nezbytným krokem vyhodnocení sledovaných závisle proměnných, neboli sledovaných chromatografických parametrů.

3.2 Metoda částečných nejmenších čtverců

Metoda částečných nejmenších čtverců (partial least squares, PLS) je metoda, kterou použijeme pro vyhodnocení naměřených dat získaných z vygenerovaných experimentů. PLS je vícerozměrná regresní metoda, používá se při vyhodnocování složitých vícefaktorových úloh, nebo když úloha obsahuje velké množství dat. Dále je metoda PLS schopna lépe pracovat s nulami či chybějícími daty⁶.

3.3 Projekce významnosti proměnných

Projekce významnosti proměnných neboli VIP plot (variable importance in projection) je nástroj sloužící k interpretaci dat vyhodnocených metodou PLS. Jedná se o sloupcový graf znázorňující míru celkové významnosti vlivu studovaných nezávisle proměnných na vytvořený model⁷. Přesáhne-li hodnota faktoru hodnotu 0,8, je možné danou nezávisle proměnnou považovat za významnou, je-li však hodnota nezávisle proměnné menší než 0,8, je možné prohlásit, že ze statistického hlediska studovaná nezávisle proměnná významně neovlivňuje daný model⁸. Projekce významnosti proměnných je vhodným nástrojem na začátku interpretace získaných dat, protože nám dává pouze informaci o významnosti daného faktoru v rámci celého modelu, ne však informace o jeho vlivu na jednotlivé závisle proměnné.

3.4 Graf koeficientů

Graf koeficientů (Coefficient plot) je sloupcový graf, znázorňující hodnoty regresních koeficientů a variabilitu dat. Tento typ interpretace dat nám, na rozdíl od projekce významnosti proměnných, sděluje individuální vliv jednotlivých nezávisle proměnných na závisle proměnné. Pokud se hodnota koeficientu pro daný faktor pohybuje v kladných hodnotách, lze říci, že zvyšování hodnoty této nezávisle proměnné bude mít pozitivní odezvu⁸. Je-li hodnota regresního koeficientu nezávisle proměnné v záporných hodnotách, dochází k opačnému efektu. Každé nezávisle proměnné přísluší interval spolehlivosti, který podává informaci o relevanci získané informace.

3.5 Sweet spot

Sweet spot plot je nástroj, pomocí kterého lze interpretovat experimentální prostor. Při zvolení vybraných úrovní kvalitativních nezávisle proměnných za konstantní a určení mezí přijatelných hodnot pro závisle proměnné lze vyobrazit experimentální prostor v podobě 2D grafu. Na grafu lze následně nalézt informace o optimálních podmínkách a jejich robustnosti v rámci stanovených mezí závisle proměnných. Část experimentálního prostoru, kde jsou splněny všechny stanovené meze, se nazývá sweet spot. Ten je zpravidla zvýrazněn zelenou barvou, naopak části nesplňující všechny stanovené meze jsou od sebe rozděleny a barevně odlišeny^{8,9}.

3.6 Optimalizér

Optimalizér je nástroj sloužící k vypočítání optimálních podmínek napříč celým statistickým modelem na základě zadaných mezí (minimum, cíl a maximum) závisle proměnných pro dosažení hodnot těchto závisle proměnných patřících do zadaných intervalů⁸. Jako minimum volíme nejnižší hodnotu závisle proměnné, která je považována za dostačující. Pro rozlišení se jedná o hodnotu 2, u USP tailing se jedná o hodnotu 1,2, pro DF o hodnotu 0,9, hodnota pro SA je nastavována individuálně a pro CP vycházíme z výše uvedeného vzorce. Při volbě cílové hodnoty závisle proměnné volíme ideální hodnotu, kterou by měla závisle proměnná dosáhnout, tyto hodnoty jsou voleny individuálně, mnohdy je tato hodnota záměrně nadhodnocena, chceme-li dosáhnout co nejvyšších hodnot. Maximum závisle proměnné volíme v případě, že chceme najít separační podmínky, při kterých nedojde k dosažení nežádoucích hodnot závisle proměnných.

4 Fáze po Design of Experiments

4.1 Test nejlepších podmínek separace

Jako první úkon ve fázi po DoE je vyzkoušet stanovení za vypočtených nejvhodnějších podmínek separace.

4.2 Screening kolon

Druhý úkonem ve fázi po DoE je provést screening kolon. Do screeningu kolon je ideální zahrnout co nejvíce kolon se stejnou stacionární fází, která nám vyšla jako optimální při vyhodnocování DoE, které máme k dispozici. Dobré je také do seznamu testovaných kolon zahrnout několik kolon s podobnou stacionární fází, jako je například C8 a C18 nebo phenyl-hexyl a biphenyl.

4.3 Analýza hlavních komponent

V poslední fázi screeningu kolon je nutné vyhodnotit závisle proměnné z chromatogramů. Tato získaná data následně musíme statisticky vyhodnotit analýzou hlavních komponent. Analýzu hlavních komponent můžeme provádět za pomoci statistických software jako je například doplňkový nástroj Microsoft Excel, XL Stat.

První hlavní komponenta nám popisuje největší část rozptylu dat. Druhá hlavní komponenta popisuje druhou největší část rozptylu dat, která není obsažená v první hlavní komponentě¹⁰. Grafickou pomůckou pro znázornění výsledků PCA je rozptylový diagram komponentního skóre (Scatter plot). Ten nejčastěji zobrazuje hodnoty prvních dvou komponent¹¹.

Na grafu je poté možno pozorovat shluky bodů, které zastupují jednotlivé kolony, které vykazují statisticky podobné hodnoty sledovaných chromatografických parametrů. O kolonách, které se nacházejí ve shluku s kolonou, která byla použita při DoE se dá říct, že tyto kolony můžeme použít při práci s metodou aniž by byla ovlivněna selektivita metody. V případě, že při screeningu kolon byla nalezena kolona, která měla lepší hodnoty chromatografických parametrů a nenachází se ve shluku s kolonou použitou při DoE, je tato kolona a kolony nacházející se sní ve shluku vhodnější pro danou metodu. Oproti tomu kolony, které antikorelují, jsou na opačných stranách diagramu komponentního skóre a jsou pro metodu nevhodné.

Seznam použité literatury

- (1) Dolan, J.: *A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection*
- (2) *Český lékopis 97*, (1997)
- (3) United States Pharmacopoeial Convention, *United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34*. (2016).
- (4) *Empower System Suitability* - Quick reference guide, 71500031605, Revision A, Waters (2002).
- (5) Fallah, M. Z.El.; Martin, M.: Influence of the Peak Height Distribution on Separation Performances: Discrimination Factor and Effective Peak Capacity. *Chromatographia* **24**:1, 115-122 (1987).
- (6) Miller, J. N.; Miller, J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed. Pearson Education (2005).
- (7) Farrésa, M.; Platikanova, S.; Tsakovskib, S.; Taulera, R.: Comparison of the variable importance in projection (VIP) and of the selectivity ratio (SR) methods for variable selection and interpretation. *Journal of Chemometrics* **29**, 528–536 (2015).
- (8) Eriksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Winkstrom, C.; Wold, S.: *Design of Experiments: Principles and Applications*, 3rd ed. Umetrics Academy (2008).
- (9) Terzić, J.; Popović, I.; Stajić, A.; Tumpa, A.; Stojanović, B. J.: Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **125**, 385-393 (2016).
- (10) Meloun, M.; Militký, J.; Hill, M.: *Statistická analýza více rozměrných dat v příkladech*, 1st ed. Academia (2012).
- (11) Utts, J.: *Seeing Through Statistics*, 4th ed. Cengage Learning (2014).